



Universidade de Aveiro
2013

Departamento de Engenharia de Materiais e
Cerâmica

**Ana Filipa Lopes
Correia**

**Avaliação do desempenho *in vivo* do biovidro
FastOs™**



**Ana Filipa Lopes
Correia**

**Avaliação do desempenho *in vivo* do biovidro
FastOs™**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Materiais e Dispositivos Biomédicos, realizada sob a orientação científica do Doutor José Maria da Fonte Ferreira, Professor Associado com Agregação do Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica da Universidade de Aveiro e do Doutor Paulo Pegado Cortez, Professor Auxiliar do Departamento de Clínicas Veterinárias do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto.

O júri

Presidente

Prof. Doutora Maria Margarida Tavares Lopes de Almeida
Professora auxiliar do Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor Leandro da Silva Gardel
Professor auxiliar do Departamento de Clínicas Veterinárias do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto

Prof. Doutor José Maria da Fonte Ferreira (Orientador)
Professor associado com agregação do Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica da Universidade de Aveiro

Agradecimentos

Em primeiro lugar queria agradecer ao Professor Doutor José Maria Ferreira pela oportunidade de trabalhar no mundo dos biovidros e por todo o apoio ao longo das dificuldades que fui encontrando.

Ao meu Co-orientador, Professor Doutor Paulo Cortez pela disponibilidade e ajuda que me deu ao longo destes meses.

Ao Saurabh Kapoor por tudo que me ensinou sobre vidros e pela oportunidade de aprender mais além da tese, pela paciência e pelo apoio em todos os momentos.

À Professora Doutora Patrícia Pereira pela preciosa ajuda nas análises histológicas aos implantes subcutâneos.

Aos meus colegas de mestrado, em especial à Daniela, à Ângela e à Andisheh por todo o companheirismo e apoio durante todo este tempo, sem elas esta fase teria sido muito mais difícil.

A todos os meus amigos que me ouviram e apoiaram, mesmo quando não falava de outra coisa senão da tese.

Finalmente aos meus pais e à minha irmã pela paciência e apoio incondicional, pela motivação e principalmente por terem sempre acreditado em mim quando achei que não era capaz.

A todos, que de uma maneira ou de outra estiveram presentes ao longo deste percurso, um muito obrigado!

Palavras-chave

Biovidro, bioatividade, *in vitro*, *in vivo*, ovino, regeneração óssea.

Resumo

O conceito de bioatividade surgiu com a descoberta, no início década de 70, de que algumas composições vítreas (ex.: 45S5 Bioglass®), tinham a capacidade de estabelecer uma ligação direta e estável com os tecidos vivos. Desde então, este grupo de biomateriais tem vindo a receber uma atenção cada vez maior por parte dos investigadores, tendo como motivação principal a busca de novas composições com propriedades mais adequadas para a regeneração óssea do que as composições comercialmente disponíveis.

Na presente tese, avaliou-se o desempenho *in vivo* de duas composições de biovidro do sistema diopside ($\text{CaMgSi}_2\text{O}_6$) - fluorapatite ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$) - fosfato tricálcico ($3\text{CaO}\cdot\text{P}_2\text{O}_5$) aplicados em defeitos ósseos de tamanho não crítico em carneiros, tendo também sido avaliada a biocompatibilidade dos biomateriais através da aplicação subcutânea de placas dos mesmos vidros.

O trabalho realizado também incluiu a avaliação dos materiais *in vitro*, através de estudos de biomineralização em fluido corporal simulado e estudos de degradação. Os biomateriais foram comparados com o biovidro 45S5 Bioglass®, sendo que em termos de bioatividade *in vitro*, as duas composições investigadas apresentaram um maior potencial bioativo, levando à formação de uma camada superficial de hidroxiapatite carbonatada, em contraste com a formação de calcite na composição comercial, sob condições idênticas. Os testes de degradação *in vitro* também apresentaram resultados melhores para as duas novas composições, traduzidos por variações de pH e taxas de degradação menores do que os observados no caso do 45S5 Bioglass®. A avaliação *in vivo* dos implantes subcutâneos permitiu apurar a biocompatibilidade dos biovidros testados, tendo sido considerados ligeiramente irritantes. Os resultados relativos à aplicação dos pós de vidro bioativo nos defeitos ósseos não foram obtidos em tempo útil de modo a poderem ser incluídos na presente tese.

Considerando o desempenho *in vitro* e a biocompatibilidade dos materiais estudados, estes podem apontar-se como materiais promissores para aplicações em engenharia de tecidos, particularmente na regeneração do tecido ósseo.

Keywords

Bioglass, bioactivity, *in vitro*, *in vivo*, ovine, bone regeneration.

Abstract

The concept of bioactivity came with the discovery in the early 70s, that some glassy compositions (eg. 45S5 Bioglass®), had the ability to establish a direct and stable bonding with living tissues. Since then, this group of biomaterials has been receiving increasing attention from researchers, the main motivation being the search for new compositions with bone regeneration properties more suitable than those of commercially available compositions.

In this thesis, the *in vivo* performance of two bioglass compositions in the system diopside ($\text{CaMgSi}_2\text{O}_6$) - fluorapatite ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$) - tricalcium phosphate ($3\text{CaO}\cdot\text{P}_2\text{O}_5$) was evaluated through their application in non-critical size bone defects in sheep. Their biocompatibility was also studied through their subcutaneous application of square plates from the same bioglasses.

The work also included the evaluation of materials *in vitro* by biomineralization studies, through the use of simulated body fluid and also degradation tests. The biomaterials were compared with the 45S5 Bioglass® and in terms of *in vitro* bioactivity, the two investigated compositions showed a higher bioactive potential, leading to the formation of a surface carbonated hydroxyapatite layer in contrast to the calcite layer formed on the surface of the commercial composition immersed under identical conditions. The *in vitro* degradation tests also showed better results for the two new compositions, reflected by smaller changes in pH and lower weight losses in comparison to 45S5 Bioglass®.

The *in vivo* evaluation of the subcutaneous implants allowed the determination of the biocompatibility of bioactive glasses tested, with both materials achieving a “slightly irritant” classification. Unfortunately, the results from the application of bioactive glass powders in bone defects were not obtained in time to enable their inclusion in this thesis.

Considering the *in vitro* performance and the biocompatibility of the studied biomaterials, these may be pointed as promising materials for applications in tissue engineering, particularly in bone tissue regeneration.

Índice

Índice	i
Lista de Figuras.....	v
Lista de Tabelas	ix
Abreviaturas.....	xi
CAPÍTULO 1 - Introdução e Objetivos.....	1
CAPÍTULO 2 - Revisão Bibliográfica	3
2.1 Regeneração óssea.....	3
2.1.1 Tecido Ósseo	3
2.2 Biocerâmicos	5
2.2.1 Vidros Bioativos	8
2.2.2 45S5 Bioglass® e Bioatividade	11
2.2.3 Cinética das reações.....	13
2.2.4 Componentes estruturais e Elementos dopantes.....	14
2.2.5 Biovidros na forma de partículas.....	17
2.3 Avaliação <i>in vitro</i> e desempenho <i>in vivo</i>	17
2.3.1 Ovelha/Carneiro.....	20
CAPÍTULO 3 - Procedimento Experimental.....	21
3.1 Preparação das composições vítreas	22
3.2 Obtenção dos materiais	22
3.3 Caracterização dos materiais	23
3.3.1 Distribuição do tamanho médio de partícula.....	23
3.3.2 Difração de raio-X (DRX).....	23
3.3.3 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	23

3.3.4 Ressonância magnética nuclear (NMR)	23
3.4 Ensaios <i>in vitro</i>	24
3.5.1 Imersão em fluido corporal simulado (SBF)	24
3.5.2 Testes de degradação	26
3.6 Estudos <i>in vivo</i>	27
3.6.1 Biocompatibilidade dos materiais	28
3.6.2 Desempenho <i>in vivo</i> dos pós de vidro	29
CAPÍTULO 4 - Resultados e Discussão	31
4.1 Caracterização dos materiais	31
4.1.1 Tamanho médio de partícula	31
4.1.2 Análise cristalográfica das fritas moídas	32
4.1.3 Grupos funcionais	33
4.1.4 Unidades estruturais determinadas por NMR	34
4.2 Ensaios <i>in vitro</i>	35
4.2.1 Imersão em fluido corporal simulado (SBF)	35
4.2.2 Testes de degradação	44
4.3 Avaliação <i>in vivo</i>	51
4.3.1 Implantes subcutâneos	51
4.3.1.1 Resposta inflamatória aos implantes de vidro bioativo	51
4.3.1.2 Análise histológica	52
4.3.2 Pós	58
CAPÍTULO 5 - Conclusões e Trabalho Futuro	61
5.1 Conclusões	61
5.2 Trabalho Futuro	62
CAPÍTULO 6 - Bibliografia	63

ANEXO I – Avaliação semi-quantitativa da resposta inflamatória aos implantes subcutâneos.....	71
--	----

Lista de Figuras

Figura 1 - Organização hierárquica do osso. Adaptado de [15].	4
Figura 2 - Ciclo de remodelação óssea. Adaptado de [16].	5
Figura 3 - Estrutura de uma rede de vidro. Adaptado de [23].	9
Figura 4 - Diferentes estruturas Q que podem descrever a conectividade da rede de Si nos vidros. OB representa uma ligação de um oxigénio ligante (Si-O-Si). Adaptado de [7].	10
Figura 5 - Diagrama de bioatividade. Adaptado de [33].	12
Figura 6 - Fluxograma das etapas principais do procedimento experimental.	21
Figura 7 - Esquema representativo da localização dos implantes subcutâneos.	28
Figura 8 - Esquema da colocação dos pós dos 3 biovidros implantados.	30
Figura 9 - Colocação dos pós de vidro, (a) defeitos vazios e (b) pó colocado no 2º defeito a contar a direita.	30
Figura 10 - Distribuição do tamanho de partícula para as três composições (45S5 Bioglass [®] , TCP-20 e ZS-4).	32
Figura 11 - Difractogramas de raios-X dos três vidros (45S5 Bioglass [®] , TCP-20 e ZS-4).	33
Figura 12 - Espetros de FTIR dos três vidros (45S5 Bioglass [®] , TCP-20 e ZS-4).	33
Figura 13 - Espetros NMR para os vidros TCP-20 e ZS-4, (a) espectro ²⁹ Si e (b) espectro ³¹ P.	35
Figura 14 - Difractogramas após imersão em SBF do biovidro TCP-20.	36
Figura 15 – Difractogramas após imersão em SBF do biovidro ZS-4.	36
Figura 16 - Difractogramas após imersão em SBF do biovidro 45S5 Bioglass [®]	38
Figura 17 - Espetros de FTIR do biovidro TCP-20 antes e após imersão em SBF.	40
Figura 18 - Espetros de FTIR do biovidro ZS-4 antes e após imersão em SBF.	41

Figura 19 - Espectros de FTIR do biovidro 45S5 Bioglass® antes e após imersão em SBF.....	43
Figura 20 - Curvas de evolução do pH ao longo dos 5 dias de teste.....	44
Figura 21 - Representação gráfica dos valores de pH final e da perda de peso final de cada composição.	46
Figura 22 - Perfil de libertação dos elementos presentes nas composições em estudo após o teste de degradação.	47
Figura 23 - (a) Difrátogramas e (b) FTIR dos vidros após o teste de degradação.....	50
Figura 24 - Imagens microscópicas das cápsulas fibrosas dos três materiais: (a) 45S5 Bioglass®, (b) TCP-20 e (c) ZS-4. Hematoxilina-eosina(HE), ampliação de 2X.	53
Figura 25 – Cápsula que rodeava um implante de 45S5 com neovascularização (seta vermelha) e presença de neutrófilos (seta amarela) e de macrófagos (seta verde). HE, 40X	54
Figura 26 - Neutrófilo (seta amarela) em cápsula que rodeava um implante de TCP-20. HE, 40X.....	55
Figura 27 - Plasmócito (seta amarela) na cápsula que rodeava um implante de 45S5. HE, 40X.....	56
Figura 28 - Célula gigante de corpo estranho (seta amarela) na cápsula de um implante de ZS-4. HE, 40X.....	56
Figura 29 - Micrografias de SEM dos implantes de 45S5 Bioglass® (1), TCP-20 (2) e ZS-4 (3), (a) antes e (b) depois da implantação.	57
Figura 30 - Radiografias do osso após implantação dos materiais, fêmur esquerdo com ZS-4 e fêmur direito com TCP-20; radiografia do osso sem ser implantado, a meio.	58
Figura 31 - Segmentos de fêmur de ovino onde são observáveis os defeitos enxertados na cortical femural, para as três composições utilizadas: (a) 45S5 Bioglass®, (b) TCP-20 e (c) ZS-4.	59
Figura 32 - Tabela da avaliação semi-quantitativa dos implantes do biovidro 45S5 Bioglass®.....	71

Figura 33 - Tabela da avaliação semi-quantitativa dos implantes do biovidro TCP-20.71

Figura 34 - Tabela da avaliação semi-quantitativa dos implantes do biovidro ZS-4..... 72

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Aplicações dos biocerâmicos. Adaptado de [4].....	6
Tabela 2 - Forma, fase e função dos biocerâmicos. Adaptado de [4].....	7
Tabela 3 - Concentrações iônicas (mM) do plasma sanguíneo humano e do SBF. Adaptado de [68,70].	18
Tabela 4 – Composições vítreas (percentagem em peso).	22
Tabela 5 - Ordem, fórmula química, quantidade, marca e pureza dos reagentes para 1L de SBF.	24
Tabela 6 - Classificação semi-quantitativa dos implantes segundo o grau de irritação. Adaptado de (ISO - 10993-6).	53

Abreviaturas

DRX – Difração de raios-X

FTIR – Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

HA – Hidroxiapatite

HCA – Hidroxiapatite carbonatada

ICP – Espectroscopia de emissão por plasma induzido acoplado

SBF – Fluido corporal simulado

SEM – Microscopia eletrônica de varrimento

Tris – (Tri-hidroximetil)aminometano

CAPÍTULO 1 - Introdução e Objetivos

Biomateriais são todos os tipos de materiais capazes de interagir com sistemas biológicos para tratar, fortalecer ou substituir um tecido, um órgão ou uma função corporal. Nos últimos anos, a necessidade de novos materiais, produtos e técnicas cirúrgicas têm vindo a crescer de forma contínua. Esse aumento tem como principais causas o aumento da esperança média de vida, resultando no crescimento da incidência de doenças degenerativas como a osteoporose, o sedentarismo, resultando em osteoartrite degenerativa, a participação crescente em desportos passíveis de causar ferimentos traumáticos, e a maior consciencialização por parte dos pacientes e dos médicos acerca da morbidez associada à recolha de autoenxertos. Um dos tecidos mais transplantados é o tecido ósseo, sendo que a tendência atual de substituir os autoenxertos e os aloenxertos por materiais sintéticos depara-se com o grande desafio de imitar o tecido vivo do ponto de vista mecânico, químico, biológico e funcional [1,2].

Nos últimos 30 anos, vários tipos de materiais cerâmicos bioativos têm sido investigados para reparação ou substituição de tecidos duros como o osso. Uma característica especial desses materiais é a capacidade de interagirem com o ambiente biológico e estimularem a osteogénese, um processo que favorece a diferenciação de células mesenquimais, levando à formação de células osteoprogenitoras e dando assim origem ao novo osso. Dentro dos cerâmicos bioativos, os que têm tido maior atenção por parte dos investigadores são os vidros bioativos, ou biovidros, existindo uma vasta gama de composições no mercado. Estas composições têm sido modificadas ao longo dos anos com o objetivo de preencher algumas das falhas detetadas nas composições comercialmente utilizadas, com o objetivo de adequar ainda mais as suas características para aplicações em regeneração óssea [3,4].

O objetivo principal da presente tese centra-se, assim, no estudo da aplicação *in vivo* de partículas e de monólitos do vidro bioativo FastOsTM do sistema diopside ($\text{CaMgSi}_2\text{O}_6$) - fluorapatite ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$) - fosfato tricálcico ($3\text{CaO} \cdot \text{P}_2\text{O}_5$), para a regeneração de defeitos ósseos e para a avaliação da resposta tecidual, respetivamente, tendo a ovelha como modelo animal. As composições em estudo foram escolhidas com base em estudos anteriores e devido aos resultados promissores obtidos [5,6].

A presente tese está organizada em 5 capítulos. O capítulo 1 diz respeito à introdução e objetivos do presente estudo. No capítulo 2, apresentar-se-á uma revisão bibliográfica de assuntos relevantes para a contextualização dos resultados e sua discussão. O procedimento experimental é abordado no capítulo 3. Os resultados serão analisados e discutidos no capítulo 4. Finalmente, as principais conclusões e recomendações para trabalho futuro serão apresentadas no capítulo 5.

CAPÍTULO 2 - Revisão Bibliográfica

2.1 Regeneração óssea

O osso é o segundo tecido mais transplantado (depois do sangue), com mais de 2,2 milhões de operações de enxertos ósseos realizados anualmente em todo o mundo, para reparar sobretudo defeitos ósseos em ortopedia e odontologia. Os defeitos ósseos são normalmente devidos à excisão de tumores, trauma ou malformações congénitas como fendas palatinas. Na maioria dos procedimentos são utilizados autoenxertos, colhendo-se osso do próprio paciente. Os autoenxertos são a opção preferencial uma vez que possuem a estrutura natural do osso, contêm células ósseas e células progenitoras, bem como os fatores de crescimento naturais necessários para uma remodelação óssea bem-sucedida. No entanto, a quantidade de osso disponível é limitada e a reparação óssea no local dador tende a demorar mais tempo e a ser mais dolorosa do que a do osso intervencionado. Os aloenxertos, de dadores ou cadáveres, são boas alternativas aos autoenxertos, mas além de serem caros possuem algum risco de transmissão de doenças e de reações imunológicas adversas no hospedeiro. Estas limitações têm conduzido a um aumento da necessidade de substitutos ósseos sintéticos [7–10].

No caso do tecido ósseo, os materiais usados devem ser idealmente osteoindutivos (capazes de promover a diferenciação de células progenitoras até uma linhagem osteoblástica), osteocondutores (suportarem o crescimento ósseo e estimular o crescimento interno do osso circundante), e serem capazes de osteointegração (integrarem-se no osso envolvente) [11,12].

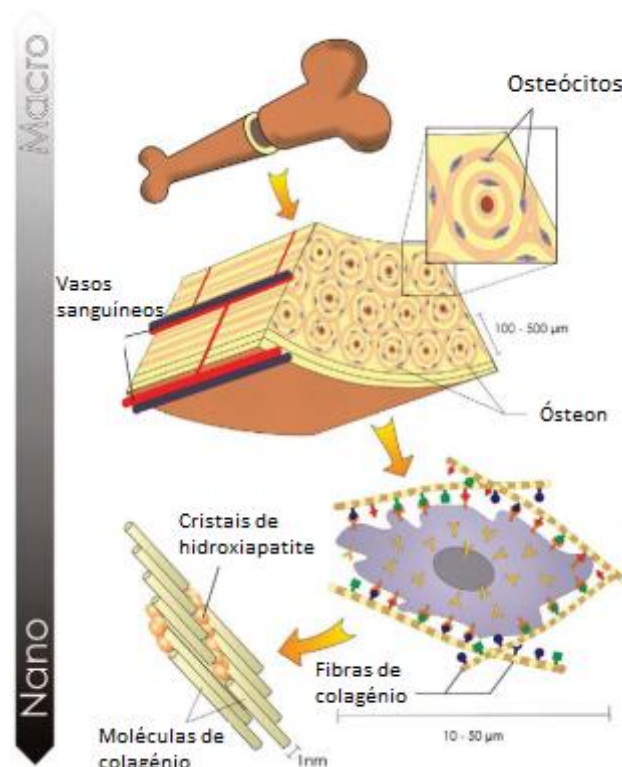
2.1.1 *Tecido Ósseo*

O tecido ósseo no esqueleto adulto é organizado em duas formas estruturais: osso trabecular, também chamado de osso esponjoso (cerca de 20% do esqueleto total) e osso cortical ou compacto (cerca de 80% do esqueleto total). As proporções destas duas formas de osso diferem nos vários locais do esqueleto. O osso cortical é muito denso, tendo apenas uma porosidade de 10% e pode ser dividido em diferentes subgrupos consoante a sua arquitetura: ossos longos (fémur e tibia), ossos curtos (punho e tornozelo) e ossos planos

(crânio e ossos irregulares como as vértebras e o sacro). Já o osso trabecular apresenta uma elevada porosidade, 50-90%, fazendo com que a sua resistência à compressão seja cerca de 20 vezes inferior à do osso cortical. Este tipo de osso encontra-se nas metáfises dos ossos longos, coberto por osso cortical, e nos corpos vertebrais [13,14].

Tal como acontece com todos os órgãos do corpo, o tecido ósseo possui uma organização hierárquica com diferentes escalas de comprimento, que se estendem em várias ordens de grandeza, desde a macro-escala até aos componentes nanoestruturados (matriz extracelular), como se pode ver pela Figura 1. A matriz extracelular óssea compreende uma componente orgânica não mineralizada (predominantemente colagénio tipo-I) e uma componente inorgânica mineralizada (composto tipo placa de 4 nm de espessura de mineralites de apatite carbonatada). Além disso, possui mais de 200 tipos diferentes de proteínas de matriz não colagénicas (glicoproteínas, proteoglicanos e sialoproteínas) que contribuem para a abundância de sinais químicos no ambiente extracelular. A estrutura do nanocompósito (composto por fibras de colagénio flexíveis e rígidas reforçadas com cristais de hidroxiapatite) é responsável por uma parte essencial na resistência à compressão e da elevada tenacidade à fratura do osso [11].

Figura 1 - Organização hierárquica do osso.
Adaptado de [15].



A criação, manutenção e reabsorção do tecido ósseo resulta da interação de três tipos de células: os osteoblastos, os osteócitos e os osteoclastos. Todos eles possuem tarefas definidas e que são essenciais para a manutenção de um osso saudável e para a remodelação óssea. Os osteoblastos têm a função de sintetizar e regular a deposição e mineralização da matriz extracelular do osso e ainda respondem a estímulos mecânicos. Os osteócitos, que derivam dos osteoblastos, permitem a calcificação da matriz osteoide, mantêm a homeostasia do cálcio no sangue e funcionam ainda como células ósseas mecanosensoriais. Por último, os osteoclastos são as células responsáveis pela reabsorção óssea. O ciclo de remodelação óssea está esquematicamente representado na Figura 2 [13].

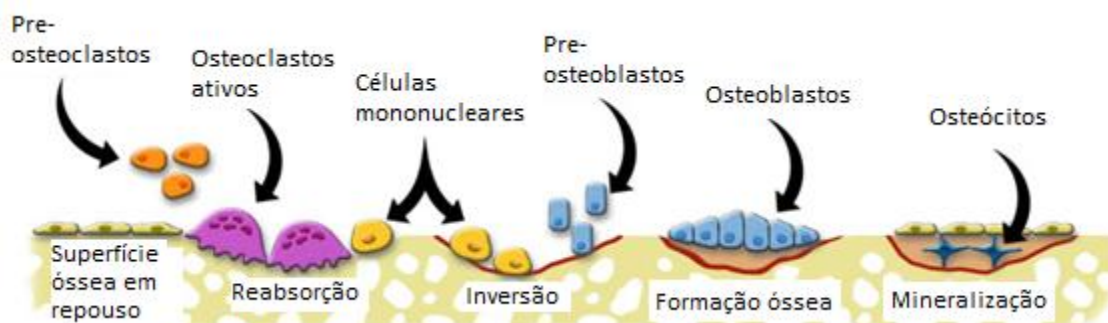


Figura 2 - Ciclo de remodelação óssea. Adaptado de [16].

Em geral, os materiais utilizados para substituir os autoenxertos e os aloenxertos, e para contornar os problemas derivados do seu uso, são os biocerâmicos que incluem os vidros e os cerâmicos bioativos, os polímeros sintéticos e biológicos e ainda os seus compósitos. O processo ideal considerado seria que o material fosse reabsorvido e substituído ao longo do tempo pelo tecido recém-regenerado do organismo [11].

2.2 Biocerâmicos

Nos últimos 30-40 anos, têm havido um grande avanço no desenvolvimento de materiais para aplicações médicas, sendo que os materiais cerâmicos têm sido os mais investigados para a reparação e reconstrução do esqueleto humano. Os materiais cerâmicos inseridos nesta classe de implantes médicos são geralmente denominados por biocerâmicos

Atualmente, cerca de 60% dos substitutos ósseos disponíveis envolvem materiais biocerâmicos, quer isoladamente, quer combinados com outros materiais [4,17–19].

Os biocerâmicos são produzidos numa variedade de formas e fases e servem muitas funções diferentes na reparação de várias partes do corpo humano. Os biocerâmicos são, por exemplo, utilizados para preencher espaços enquanto os processos naturais de reparação restabelecem a função. Algumas das aplicações clínicas dos biocerâmicos estão apresentadas na Tabela 1 [4].

Tabela 1 - Aplicações dos biocerâmicos. Adaptado de [4].

Aplicações clínicas	Biocerâmicos
Reparação craniana	Vidros Bioativos
Reconstrução maxilofacial	Al ₂ O ₃ ; HA; Compósitos de PLA e HA; Vidros bioativos
Preenchimentos de espaços ósseos	TCP; Grânulos de vidro bioativo; Grânulos de vitro-cerâmico
Implantes dentários	Al ₂ O ₃ ; HA; revestimentos de HA; Vidros bioativos

Relativamente às fases estruturais, os biocerâmicos podem ser monocristais, policristalinos (alumina ou hidroxiapatite), vidros, vitro-cerâmicos ou compósitos. A fase ou fases usadas dependem das propriedades e funções requeridas para cada aplicação. Todos os biocerâmicos podem ser produzidos tanto na forma porosa como densa, assim como em monólitos, pós, grânulos ou na forma de revestimentos [4,17,20]. Na Tabela 2 estão apresentadas as diferentes formas, fases e respectivas funções dos biocerâmicos.

Tabela 2 - Forma, fase e função dos biocerâmicos. Adaptado de [4].

Forma	Fase	Função
Pó	Policristalino	Preenchimento de espaços, tratamento
	Vidro	terapêutico, regeneração de tecidos
Revestimento	Policristalino	Ligação de tecidos, tromboresistência, proteção anticorrosiva
	Vidro	
	Vitro-cerâmico	
Monólito	Monocristal	Substituição e aumento de tecidos, substituição de partes funcionais
	Policristalino	
	Vidro	
	Vitro-cerâmico	
	Compósito	
	(multifásico)	

De acordo com o tipo de biocerâmicos a utilizar e da sua interação com o tecido hospedeiro, estes podem ser classificados como bioinertes ou bioativos. Estes últimos podem ainda ser reabsorvíveis ou não-reabsorvíveis. Do ponto de vista químico, estes materiais podem ser preparados a partir de alumina, zircónia, fosfatos de cálcio, compostos à base de sílica e outros produtos químicos [17,20].

Durante os anos 50, o principal objetivo era utilizar materiais cerâmicos inertes que não tinham qualquer reação com os tecidos vivos. A ausência de toxicidade de um material específico era suficiente para considerá-lo como biocompatível. No entanto, esta geração de cerâmicos, como a zircónia e a alumina, não era reconhecida pelo organismo, o que levava a reações de corpo estranho, ou seja, o implante ou material era rodeado por uma cápsula fibrosa que o isolava. Na década de 80, a abordagem mudou radicalmente, tendo-se seguido pela direção oposta, ou seja, o objetivo era implantar cerâmicos que reagissem com o ambiente envolvente por forma a produzir osso novo, como acontece com certos fosfatos de cálcio e com os vidros, ambos bioativos [4,20,21].

2.2.1 Vidros Bioativos

Em 1969, Larry Hench [4] e os seus colegas descobriram que o osso se conseguia ligar quimicamente a certas composições de vidro. Esses vidros ficaram conhecidos como vidros bioativos, tendo por base a seguinte definição: um material bioativo é aquele que provoca uma resposta biológica específica na interface do material, o que resulta na formação de uma ligação entre os tecidos e esse material [4].

Os vidros bioativos têm sido muito investigados como materiais para substituição óssea e como enxertos ósseos pois possuem então a capacidade de criar uma ligação forte entre a superfície do material e o tecido ósseo, ligação essa que é feita através da formação de uma camada de hidroxiapatite carbonatada (HCA) na superfície do vidro sendo esta similar à fase mineral do osso, o que faz com que a matriz óssea se integre espontaneamente na camada criada [4,8].

A maioria dos vidros bioativos utilizados atualmente em aplicações biomédicas é composta por uma rede de sílica modificada pela adição de certos modificadores de rede como o cálcio (Ca) e o sódio (Na) [4,20].

A base da estrutura dos vidros de sílica é a rede de tetraedros de SiO_4 ligados para formar uma rede tridimensional contínua. Os óxidos alcalinos e alcalino-terrosos são usados para modificar a estrutura da rede, reduzindo o grau de conectividade desta pela substituição de oxigénios ligantes (oxigénios ligados ao silício) por oxigénios não-ligantes (oxigénios ligados a modificadores de rede) [22]. A estrutura geral de uma rede de vidro está representada esquematicamente na Figura 3.

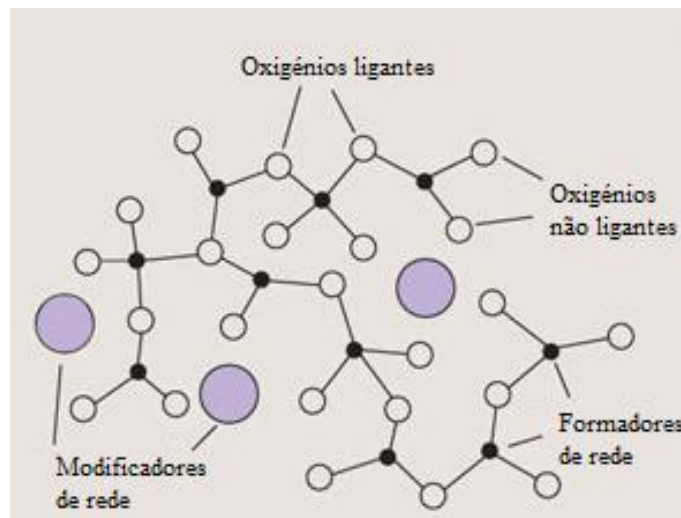


Figura 3 - Estrutura de uma rede de vidro. Adaptado de [23].

Os modificadores de rede são componentes muito importantes uma vez que abrem a estrutura do vidro e fazem com que a temperatura de transição vítrea diminua, alterando assim as suas propriedades. Assim, através da incorporação de certos modificadores específicos, as composições vítreas e as suas propriedades podem ser ajustadas consoante a sua aplicação [22].

Os modificadores de rede não são elementos capazes de formar um vidro, e por isso apenas alteram a estrutura criada pelo formador. Além destes dois tipos de elementos, existem ainda outros que, apesar de não serem formadores, podem substituir parcialmente o elemento formador presente na sua composição, sendo por isso denominados de intermediários, pois possuem um comportamento intermédio entre o dos formadores e o dos modificadores [24].

Em vidros bioativos contendo silício e fósforo, o silício funciona como formador e o fósforo, muito embora origine estruturas do tipo PO_2 e seja considerado um formador, na realidade tende a formar agregados isolados do tipo ortofosfato (possui quatro oxigénios não ligantes) [25].

Para melhor compreender a estrutura dos biovidros à base de silício, é necessário conhecer as diferentes unidades estruturais que podem existir. Uma unidade de silicato é

usualmente representada estruturalmente por Q^n em que Q se refere ao átomo de silício e n ao número de oxigénios ligantes. Resumidamente, as espécies Q^0 representam um tetraedro isolado, as Q^1 dímeros, as Q^2 estruturas lineares (cadeias ou anéis de silicato), as Q^3 estruturas bidimensionais (cadeias ou camadas de silicatos) e as Q^4 estruturas tridimensionais (redes silicatadas) [25,26]. Os diferentes tipos de unidades de silicato referidas, estão esquematizadas na Figura 4.

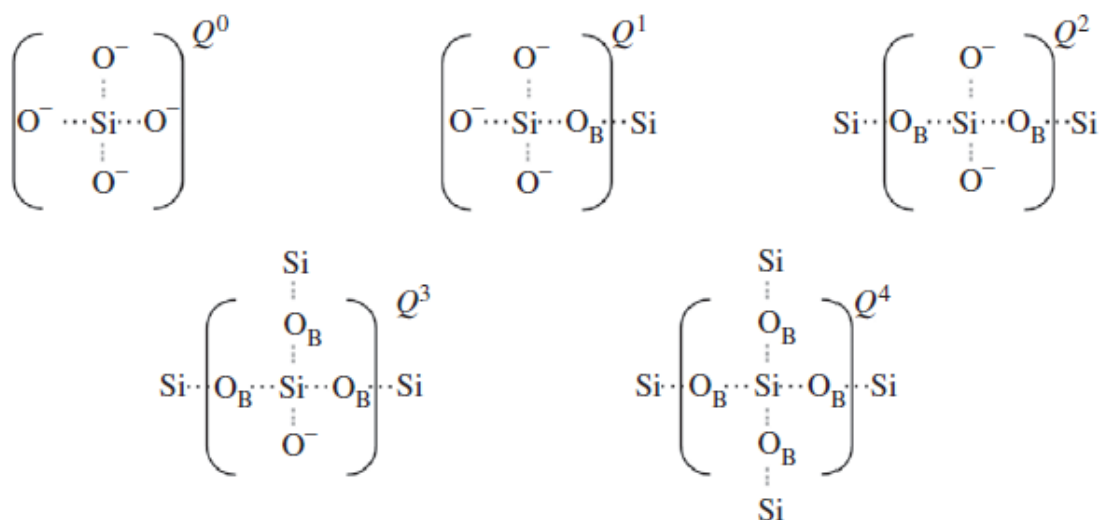


Figura 4 - Diferentes estruturas Q que podem descrever a conectividade da rede de Si nos vidros. OB representa uma ligação de um oxigénio ligante (Si-O-Si). Adaptado de [7].

A adição de modificadores de rede leva à existência de uma grande concentração de oxigénios não ligantes, e uma vez que há muita disponibilidade de oxigénio não pode ser simplesmente distribuído um átomo por tetraedro. Assim, a estrutura geralmente contém unidades Q^0 , Q^1 , Q^2 e Q^3 , sendo que há sempre uma que predomina, dependendo claro da composição do vidro [27].

Tem sido reportado que pode ser previsto um maior nível de bioatividade quando as unidades são predominantemente Q^2 , que são por vezes reticuladas através de unidades Q^3 , enquanto as unidades Q^1 terminam as cadeias [28].

Desta forma, o conhecimento da estrutura das composições que se pretendem estudar é essencial pois a bioatividade destas está intrinsecamente relacionada com a dissolução da rede do vidro.

2.2.2 45S5 Bioglass® e Bioatividade

O vidro bioativo designado por 45S5 Bioglass® foi a composição mais investigada para aplicações biomédicas, contendo 45% de SiO_2 , 24.5% de Na_2O , 24.4% de CaO e 6% de P_2O_5 (percentagem em peso). As principais características composicionais que são responsáveis pela bioatividade deste vidro são o seu baixo teor de SiO_2 (comparando com outros vidros à base de sílica), o seu elevado teor de Na_2O e de CaO , e o seu alto rácio $\text{CaO}/\text{P}_2\text{O}_5$ [4,29,30].

Hench e os seus colaboradores [4] estudaram sistematicamente uma série de vidros nos sistemas de 4 componentes com um teor constante de 6% de P_2O_5 e dividiram as composições estudadas em três regiões de acordo com a sua bioatividade. De acordo com os seus critérios de apreciação, vidros bioativos com composições no sistema $\text{SiO}_2\text{--Na}_2\text{O--CaO--P}_2\text{O}_5$ com teores de $\text{SiO}_2 < 55\%$ de (como é o caso do vidro 45S5 Bioglass®) exibem um índice de bioatividade elevado (região A) e ligam-se quer aos tecidos duros, quer aos tecidos moles. Os vidros da região A são alegadamente osteoprodutores (o osso cresce na superfície do material devido à maior atividade osteoblástica) e osteocondutores. Os vidros com composições na região B exibem apenas osteocondutividade, segundo os mesmos autores. Já as composições da região C com maiores quantidades de sílica ($> 60\%$), possuem estruturas mais polimerizadas (maior número de ligações do tipo por ponte de oxigénio) e apresentam, por consequência, menores taxas de dissolução, sendo consideradas composições bioinertes ou bioinativas. Para além disso, existe ainda a região D onde as composições são muito solúveis e por isso são reabsorvidas rapidamente [4,31,32]. O diagrama da Figura 4 representa as classes de bioatividade referidas, segundo Hench [4].

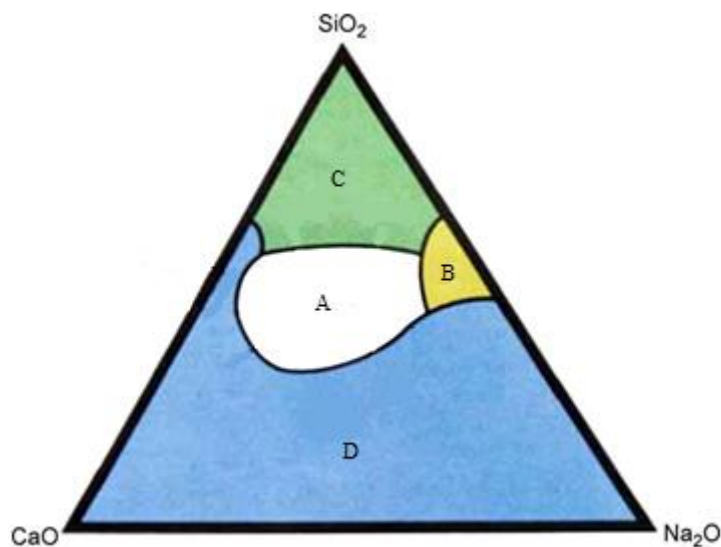


Figura 5 - Diagrama de bioatividade. Adaptado de [33].

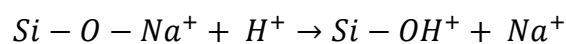
Uma das principais desvantagens do biovidro 45S5 Bioglass® está relacionada com a sua elevada solubilidade: a maior parte dos iões libertados pode ser transportada para longe do local de implantação através dos fluidos corporais antes de se poder formar osso novo, e uma vez que se degrada muito rápido, a taxa de reabsorção é mais alta que a taxa de formação de novo osso. A presença de metais alcalinos também é uma desvantagem uma vez que a dissolução destes provoca alterações no pH que prejudicam a viabilidade celular. Além disso, as suas propriedades mecânicas não são completamente adequadas para aplicações em ossos que suportam muito peso [34].

O controlo das reações de superfície e, consequentemente, da biodegradação e bioatividade de materiais implantados pode ser alcançado através da modificação da composição do biovidro. De facto, variando a natureza química e/ou a concentração dos componentes do biovidro, certas propriedades mecânicas e biológicas podem ser otimizadas para determinadas aplicações clínicas, nomeadamente na regeneração óssea [34,35].

2.2.3 Cinética das reações

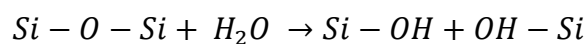
Segundo Hench [4], existem 11 etapas no processo de ligação completa do vidro bioativo ao osso. As etapas 1 até 5 são químicas e as restantes são relativas á resposta biológica [4,36].

Etapa 1 – Reações de troca rápida dos iões entre os modificadores da rede do vidro (Na^+ e Ca^{2+}) com os iões H^+ (ou H_3O^+) da solução, levando à hidrólise dos grupos de sílica e criando grupos silanol (Si-OH) na superfície do vidro.



O pH da solução aumenta devido ao consumo de iões H^+ .

Etapa 2 – O aumento do pH leva ao ataque da rede do vidro e à dissolução de sílica na forma de ácido silícico, $\text{Si}(\text{OH})_4$, na solução e à contínua formação de grupos silanol na superfície do vidro.



Etapa 3 – Condensação e polimerização de uma camada amorfa rica em SiO_2 (tipicamente com 1-2 μm de espessura) na superfície do vidro pobre em Na^+ e Ca^{2+} .

Etapa 4 – Migração dos iões Ca^{2+} e $(\text{PO}_4)^{3-}$ da superfície do vidro através da camada rica em SiO_2 e da solução, levando à formação de uma camada de fosfato de cálcio amorfo na superfície da camada anteriormente formada.

Etapa 5 – Cristalização da camada de fosfato de cálcio amorfo pela incorporação de aniões OH^- e CO_3^{2-} da solução, formando uma camada de hidroxiapatite carbonatada.

Etapa 6 – Adsorção e desorção de fatores de crescimento biológicos na camada de hidroxiapatite por forma a ativar a diferenciação das células estaminais.

Etapa 7 – Remoção dos detritos do local pelos macrófagos, permitindo que as células diferenciadas ocupem esse espaço.

Etapa 8 – Ligação das células estaminais na superfície bioativa.

Etapa 9 – Diferenciação das células estaminais em osteoblastos.

Etapa 10 – Produção de matriz extracelular pelos osteoblastos que resulta na formação de tecido ósseo.

Etapa 11 – Cristalização da matriz inorgânica de fosfato de cálcio para envolver as células ósseas numa estrutura composta viva. Estas, por sua vez, convertem-se em osteócitos.

É esta a sequência de acontecimentos em que o vidro bioativo participa no processo de reparação óssea, permitindo a criação de uma ligação direta do material ao tecido [29,36,37].

Assim, os vidros bioativos suportam a atividade enzimática, promovem a adesão, crescimento e diferenciação osteoblástica e induzem a diferenciação das células mesenquimais em osteoblastos. Certas composições estimulam o aumento da secreção de fatores de crescimento angiogénicos (fator de crescimento endotelial vascular) a partir de fibroblastos e podem induzir a infiltração de um número significativo de vasos sanguíneos, levando assim à vascularização do local a tratar [38–40].

A forte ligação que se estabelece entre o material e o tecido ósseo pensa-se que, para além da formação da camada de HCA também seja devida à interação das fibrilas de colagénio do osso hospedeiro com os nódulos de hidroxiapatite formados no vidro [4,8,41,42].

2.2.4 Componentes estruturais e Elementos dopantes

Além da estrutura dos vidros, na literatura é possível verificar que muitos estudos indicam que os produtos da dissolução iónica de materiais inorgânicos como os vidros são a chave para entender o comportamento destes materiais *in vitro* e *in vivo*. As reações que ocorrem na superfície do vidro permitem a libertação de quantidades importantes de iões solúveis e estes iões após exposição ao ambiente fisiológico, acredita-se que afetam favoravelmente o comportamento das células humanas relacionadas com a osteogénese e a angiogénese [43].

Os produtos de dissolução dos vidros bioativos, nomeadamente os de composição semelhante ao 45S5 Bioglass®, ativam a expressão de genes que controlam a osteogénese e a produção de fatores de crescimento. Foi também verificado que o silício desempenha um papel fundamental na mineralização óssea e na ativação génica, o que tem conduzido a um aumento do interesse na substituição do cálcio por silício na hidroxiapatite sintética [44–47].

Estudos recentes têm demonstrado que uma gama de aplicações biomédicas dos vidros bioativos é limitada não apenas pelo efeito da cristalização, que diminui a bioreatividade, mas também pela sua solubilidade relativamente elevada, a qual é prejudicial para a atividade celular. A adição dos iões específicos é uma das formas de alterar o desempenho biológico dos biovidros [43]. Além do cálcio e do fósforo, a apatite óssea contém muitos elementos vestigiais diferentes que ocorrem em concentrações muito pequenas e, por isso, vários iões têm sido considerados como agentes promissores na melhoria da capacidade de formação óssea de certos materiais. A ação dos vidros pode assim ser melhorada através da adição de óxidos intermediários ou modificadores na sua composição base [48,49].

Na presente tese a composição vítrea base estudada pertence ao sistema diopside ($\text{CaMgSi}_2\text{O}_6$) - fluorapatite ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$) – fosfato tricálcico ($3\text{CaO} \cdot \text{P}_2\text{O}_5$).

Os biovidros com flúor têm sido considerados materiais com potencial em vários campos da biomedicina, nomeadamente odontologia e ortopedia. A adição de flúor em vidros bioativos é conhecida por reduzir a sua reatividade uma vez que atua como inibidor da corrosão e também por aumentar a bioatividade pois promove a formação de camadas de sílica gel na superfície dos biovidros, o que pode levar à criação posterior de fluorapatite, quimicamente mais estável que a hidroxiapatite. Além disso, o flúor é conhecido por aumentar a densidade óssea e também atua como agente anti carcinogénico [50].

O magnésio, presente neste sistema, é conhecido por ativar a fagocitose e regular o transporte ativo de cálcio, e por estes motivos tem sido frequentemente incorporado em vidros bioativos. Além disso, a sua libertação em condições fisiológicas possui efeitos benéficos no crescimento ósseo e na diminuição da reabsorção óssea no osso trabecular.

No entanto, o papel estrutural do magnésio nos vidros bioativos é ainda ambíguo, sendo que alguns estudos descrevem que este retarda a formação da camada de apatite na superfície dos biovidros, enquanto outros contradizem esses resultados [50,51].

Outros estudos revelam ainda que a presença de fósforo nos vidros bioativos torna-os mais solúveis e faz com que haja uma libertação mais rápida de sílica em solução. Segundo os estudos efetuados, o fósforo quando é libertado em quantidades controladas (<30 ppm), favorece a biomineralização e induz a transcrição de RNA mensageiro osteogénicos [50].

Além da composição base referida, foi também estudada a mesma composição mas dopada com os elementos zinco e estrôncio, composição esta escolhida com base em resultados obtidos em estudos anteriores [6,52].

O zinco é relativamente abundante no osso (o seu teor médio é de 110-300 mg por kg de osso e equivale a 28% do zinco total no corpo) e é conhecido como um elemento vestigial essencial (oligoelemento) com efeitos estimulantes na formação óssea *in vivo* (pela ativação da síntese proteica nos osteoblastos) e com propriedades anti-inflamatórias. Além disso, a adição de óxido de zinco às composições prolonga a durabilidade química dos vidros, retardando a sua dissolução e reação em solução aquosa (por exemplo nos fluidos corporais extracelulares) e melhora as suas propriedades mecânicas. O zinco é um elemento importante para muitas enzimas e na replicação do DNA em geral, e baixos níveis de zinco podem inibir o crescimento ósseo [48,53–56].

O óxido de estrôncio (SrO) também tem sido incorporado em várias composições de vidros bioativos [6,57–59]. A quantidade de estrôncio no esqueleto é de apenas 0.335% do seu conteúdo de cálcio. Os efeitos biológicos deste ião estão relacionados com a sua semelhança química com o cálcio e com os outros elementos do grupo 2A da tabela periódica. Devido à semelhança com o cálcio, apresenta um comportamento de “bone seeker”, ou seja, este elemento acumula-se no osso, pode substituir o cálcio em processos metabólicos do tecido duro e, em grandes concentrações, interfere com o desenvolvimento natural do osso. Sinergicamente, demonstrou-se que o estrôncio tem um modo de ação duplo, aumentando a formação óssea pelos osteoblastos enquanto, simultaneamente diminui a reabsorção óssea por parte dos osteoclastos [6,57].

2.2.5 Biovidros na forma de partículas

Os vidros bioativos na forma de partículas têm sido muito investigados na regeneração do osso uma vez que as suas propriedades sugerem que são uma forma apelativa para o preenchimento de defeitos ósseos. Podem adaptar-se facilmente à forma dos defeitos ósseos e tem sido demonstrado que possuem boas qualidades hemostáticas (detêm as hemorragias) e de manuseamento. Além disso, devido ao aumento da relação superfície-volume, são melhoradas as capacidades de osteocondução. Schepers *et al.* [60,61] descreveram a capacidade das partículas de vidro bioativo de agirem como agentes de enchimento para lesões ósseas. Quando implantadas nas mandíbulas de cães de raça Beagle, as partículas foram capazes de atuar como locais de nucleação para a reparação óssea, induzindo a formação de tecido ósseo ao longo de 5 mm nos defeitos das mandíbulas dos cães, após um mês da implantação [62,63].

2.3 Avaliação *in vitro* e desempenho *in vivo*

O objetivo da avaliação do desempenho *in vivo* de um biomaterial, prótese ou dispositivo médico, é determinar a sua biocompatibilidade num ambiente biológico. A biocompatibilidade é definida como sendo a capacidade que um material ou dispositivo médico tem para atuar com uma resposta apropriada do hospedeiro numa aplicação específica. A avaliação da biocompatibilidade é considerada uma medida da magnitude e da duração das alterações adversas nos mecanismos homeostáticos que determinam a resposta do hospedeiro. A biocompatibilidade reflete assim a natureza e o grau de interação entre os biomateriais e os tecidos do hospedeiro, uma das preocupações críticas nesta área de investigação [2,64,65].

Devido a questões éticas, os ensaios *in vivo* e os testes clínicos são precedidos por testes *in vitro*. No caso dos vidros bioativos, os ensaios *in vitro* mais utilizados são os que permitem aceder às características bioativas destes, ou seja, que permitem verificar se em condições semelhantes às fisiológicas é possível obter uma camada de hidroxiapatite que tornará possível a ligação entre o material e os tecidos vivos. Para isso, em 1991 Kokubo *et al.* [66] propuseram a composição de um fluido corporal simulado (SBF) com concentrações iónicas quase iguais às do plasma sanguíneo humano. Assim, poderia prever-se a formação de apatite no osso através da imersão do material a testar nesta

solução. Na Tabela 3 é possível verificar as concentrações iônicas do SBF utilizado na presente tese, segundo Tas [67], e do plasma sanguíneo humano [26,68,69].

Tabela 3 - Concentrações iônicas (mM) do plasma sanguíneo humano e do SBF. Adaptado de [68,70].

	Na^+	K^+	Ca^{2+}	Mg^{2+}	Cl^-	HCO_3^-	HPO_4^{2-}	SO_4^{2-}
Plasma	142,0	5,0	2,5	1,5	103,0	27,0	1,0	0,5
SBF	142,0	5,0	2,5	1,5	125,0	27,0	1,0	0,5

Outra das soluções muitas vezes utilizada no estudo da bioatividade dos biovidros é a solução tampão de tris-hidroxi-metil-aminometano (TRIS). Uma vez que esta solução não contém íons, à exceção dos que serão libertados pelo vidro, pode ser muito útil para a análise das etapas envolvidas na deposição de hidroxiapatite [71].

Tanto o SBF como o plasma sanguíneo são saturados no que respeita à hidroxiapatite e por esta razão, alguns pontos de nucleação são suficientes para observar a formação desta na superfície dos materiais a testar. Assim, a taxa de deposição de hidroxiapatite é muito mais elevada do que na solução tampão de TRIS, pois o grau de supersaturação relativamente à HA é alcançado muito mais facilmente em SBF. Além de se apurar a formação de hidroxiapatite na superfície dos materiais em teste, os ensaios de imersão nestas soluções também permitem avaliar a evolução do pH ao longo da degradação dos materiais, fator este muito importante para a viabilidade celular [25,71].

Podem ainda ser utilizadas soluções mais complexas, que contenham unidades biológicas como proteínas ou até mesmo contendo células, aumentando assim as semelhanças e aproximando-se mais da complexidade dos fluídos corporais reais. [71]

A etapa seguinte nos estudos *in vitro* é a colocação do material em estudo em culturas celulares que, no caso de materiais para regeneração, são geralmente culturas de células osteoblásticas ou outras linhas celulares ósseas. Relativamente às células, podem ser feitos variados testes. Usualmente são estudadas a morfologia, adesão e proliferação das células. Seguidamente, a atividade celular que no caso dos osteoblastos pode ser

verificada através da produção da enzima fosfatase alcalina. Outra proteína geralmente investigada é a osteocalcina pois a sua presença é indicativa do início da mineralização óssea [71].

Apesar das vantagens dos estudos *in vitro* e dos grandes avanços que foram feitos para cada vez melhor mimetizar a complexidade das interações existentes nos tecidos, os testes *in vivo* são essenciais para concluir com segurança a investigação do desempenho biológico dos biomateriais quando implantados num sistema vivo. A nível celular e molecular, é necessária uma melhor caracterização dessa resposta dos tecidos e cada vez que um novo biomaterial é desenvolvido, essa resposta tem de ser investigada. Sendo a avaliação *in vivo* uma questão complexa, uma vez que envolve questões éticas, o estabelecimento e a escolha de um modelo animal adequado deve permitir não só responder de forma consistente com o problema em estudo, como também deve replicar o mais fidedignamente possível a situação clínica de forma a permitir uma correta extrapolação dos resultados para o ser humano [72].

É necessário ter sempre em conta que os modelos animais são uma representação aproximada do que realmente acontece no organismo humano e que a utilização de cada animal tem as suas vantagens e desvantagens únicas [73].

Além das semelhanças em termos de considerações fisiológicas e patológicas, de acordo com Schimandle e Boden [74], os fatores de seleção animal incluem: custo de aquisição e tratamento dos animais, disponibilidade, aceitação por parte da sociedade, tolerância de detenção e facilidade de acomodação [73,75].

Outros fatores incluem: facilidade de manuseamento, resistência a infeção e doença, uniformidade entre animais, tolerância à cirurgia, instalações adequadas e a existência de uma base de dados com a informação biológica das espécies. Além disso, o tempo de vida da espécie escolhida deve ser adequado à duração do estudo. Mais especificamente, para estudos que investigam as interações osso-implante, é importante um entendimento das características ósseas específicas de cada espécie para uma posterior extrapolação dos resultados para a situação humana, como microestrutura e composição do osso, assim como as propriedades de remodelação e modelação [73,75].

Os princípios internacionais estabelecidos em relação às espécies que são adequadas para o teste de implantação de materiais no osso, determinam que cães, ovelhas, cabras, porcos ou coelhos são apropriados. Segundo os mesmos princípios internacionais, devem ser usados pelo menos 4 coelhos e pelo menos 2 de cada uma das outras espécies referidas, para cada estudo [73].

2.3.1 Ovelha/Carneiro

Apesar do uso de cães ainda superar o uso de ovelhas, o número de ovelhas utilizadas tem aumentado na última década. No período de 1990-2001, as ovelhas foram usadas em 9-12% das investigações ortopédicas que envolveram fraturas, osteoporose, extensão óssea e osteoartrite [73].

As ovelhas adultas possuem a vantagem de terem um peso corporal mais parecido aos dos humanos e por terem ossos longos com dimensões adequadas para a implantação de próteses projetadas para os humanos. Existem algumas diferenças na densidade óssea entre humanos e ovinos, com estas últimas a apresentarem uma densidade significativamente mais elevada e, por isso, uma maior robustez. Ambos possuem um padrão de crescimento ósseo similar nos implantes porosos, mas as ovelhas apresentam um crescimento maior, o que é provavelmente devido à grande quantidade de osso esponjoso no fêmur distal, em comparação com os humanos. Assim, é essencial manter uma consistência em termos de idade das ovelhas num mesmo estudo e estar ciente de que diferenças de idade podem tornar difíceis as comparações entre estudos [72,73,75].

Uma vez que a ovelha é um modelo animal adequado, o seu uso na investigação ortopédica continua a aumentar, pois apesar dos roedores serem mais baratos, possuem uma morfologia óssea diferente, além, por exemplo, das óbvias menores dimensões do osso que dificultam a colocação de enxertos [75].

CAPÍTULO 3 - Procedimento Experimental

O trabalho experimental realizado abrangeu as seguintes etapas principais: i) preparação de fritas das composições de vidro selecionadas (TCP-20, ZS-4 e 45S5) por fusão e arrefecimento rápido em água fria, ii) moagem das fritas e caracterização dos respectivos pós através de diferentes técnicas, incluindo análise do tamanho médio de partícula (COULTER), difração de raios-X (DRX), espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), e ressonância magnética nuclear (NMR), iii) ensaios *in vitro* em SBF e testes de degradação, iv) estudo do desempenho *in vivo* em ovelhas. O fluxograma acima apresenta as várias etapas referidas.

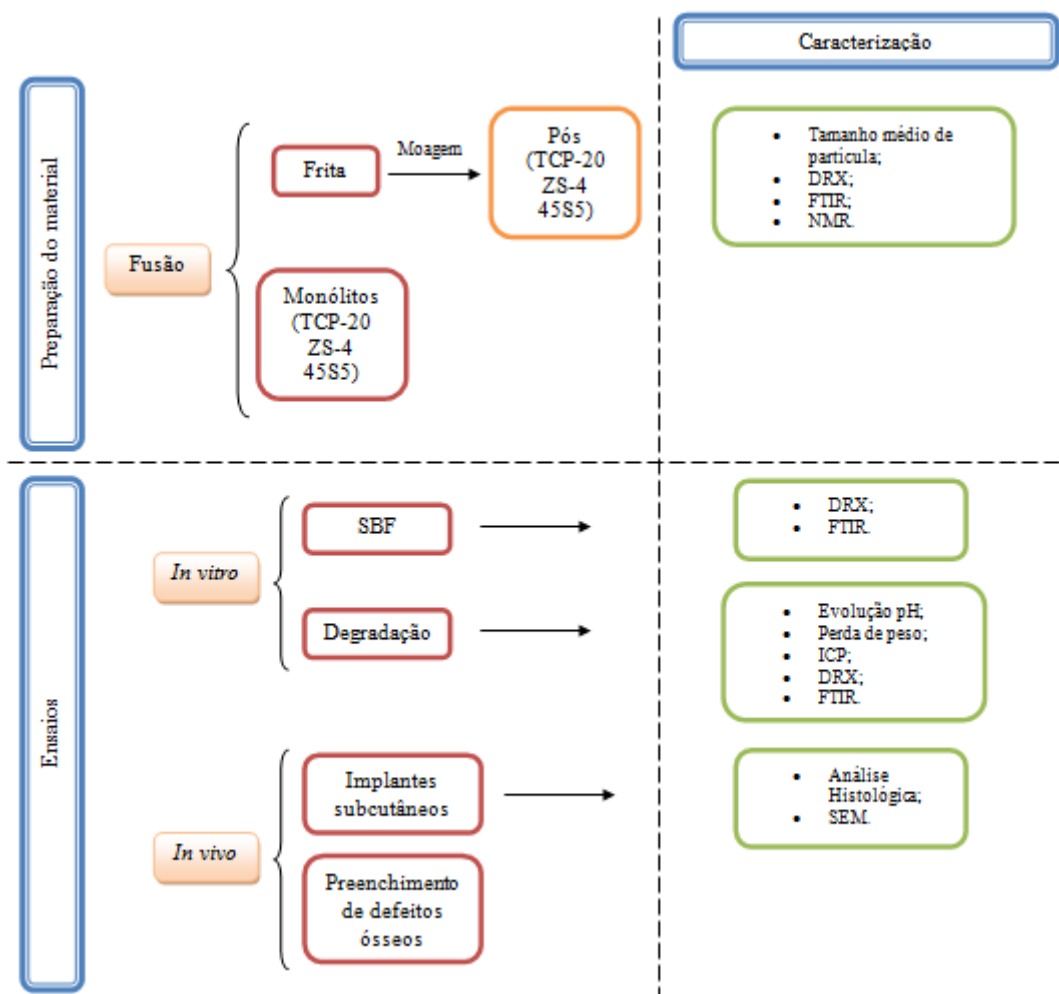


Figura 6 - Fluxograma das etapas principais do procedimento experimental.

3.1 Preparação das composições vítreas

As duas composições vítreas estudadas pertencem ao sistema diopside ($\text{CaMgSi}_2\text{O}_6$) - fluorapatite ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$) - fosfato tricálcico ($3\text{CaO} \cdot \text{P}_2\text{O}_5$). Tendo em conta a percentagem em peso de fosfato tricálcico (TCP) na composição, o primeiro vidro foi denominado de TCP-20 (20%). O segundo tem por base a primeira composição mas dopada com os iões zinco e estrôncio, com uma percentagem molecular de 4% de cada ião (o CaO foi parcialmente substituído por SrO e o MgO pelo ZnO), sendo assim denominado de ZS-4. As duas composições (em percentagem de peso) são apresentadas na tabela seguinte. Foi ainda obtido o biovidro comercial 45S5, com 45% de SiO_2 , 24.5% de Na_2O , 24.4% de CaO e 6% de P_2O_5 (percentagem em peso), por forma a comparar com as composições em estudo.

Tabela 4 – Composições vítreas (percentagem em peso).

Vidro	MgO	CaO	SiO_2	P_2O_5	CaF_2	ZnO	SrO ₂
TCP-20	13.03	33.98	38.84	13.37	0.77	-	-
ZS-4	9.74	28.51	36.66	12.62	0.73	5.16	6.57

As matérias-primas utilizadas para as composições acima referidas foram: SiO_2 (BDH chemicals Ltd.), CaCO_3 (BDH chemicals Ltd.), MgCO_3 (BDH chemicals Ltd.), NH_4PO_4 (Riedel-deHaen), CaF_2 (Aldrich), CO_3Sr (Aldrich), e ZnO (Panreac). Todas as matérias-primas possuem um grau de pureza superior a 99,0%.

3.2 Obtenção dos materiais

Das composições acima referidas, prepararam-se materiais na forma de pós e de monólitos a partir de cargas de cerca de 100 g. As matérias-primas foram moídas a seco de

modo a obter misturadas homogêneas, e depois descarbonatadas através de um tratamento térmico a 900 °C durante 1 h. Seguidamente, o vidro foi fundido num cadinho de platina a 1580 °C (1500 °C para o 45S5) durante 1 h. Os vidros foram então vazados em água fria para obtenção de fritas, ou em moldes metálicos para a obtenção de monólitos. Os provetes assim obtidos foram recozidos num forno a 600 °C por forma a eliminar as tensões termomecânicas geradas no interior do vidro durante o seu arrefecimento rápido. As fritas foram secas e moídas num moinho planetário de alta velocidade com bolas de ágata.

3.3 Caracterização dos materiais

3.3.1 Distribuição do tamanho médio de partícula

As distribuições de tamanhos das partículas das fritas moídas foram analisadas através de um instrumento de dispersão laser (COULTER LS 230, UK), adotando o modelo ótico de Fraunhofer.

3.3.2 Difração de raio-X (DRX)

A natureza amorfa dos vidros em estudo foi confirmada através da difração de raios-X usando um difratómetro Rigaku Geigerfle D/Max-Série C equipado com ampola de Cobre (radiação $K\alpha$ do Cu = 1.5405 Å, monocromatizada com filtro de Ni).

3.3.3 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Para a identificação dos grupos funcionais dos vidros recorreu-se à espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier através de um espectrómetro Mattson Galaxy S-7000, USA. Os espectros foram obtidos em modo de transmitância.

3.3.4 Ressonância magnética nuclear (NMR)

Por fim, recorreu-se à ressonância magnética nuclear, por forma a identificar as unidades estruturais Q^n predominantes em cada uma das composições de vidro em estudo. O espectro ^{29}Si foi obtido através de um espectrómetro Bruker AXS 400 a 79.52 MHz utilizando uma sonda de 7 mm a uma taxa de rotação de 5 kHz. O comprimento do pulso foi de 2 μs ,

usando um tempo de atraso de 60 s. A caulinite foi usada como referência de desvio químico. O espectro ^{31}P foi obtido através do espectrômetro Bruker AXS 400 a 161.97 MHz com pulsos de 45° , taxa de rotação de 12 kHz, tempo de atraso de 60 s e o desvio químico foi cotado em ppm de ácido fosfórico (85%).

3.4 Ensaios *in vitro*

As composições de vidro em estudo (TCP-20 e ZS-4) foram testadas *in vitro* através da imersão em fluido corporal simulado (incluindo a composição 45S5 Bioglass®) e através de estudos de degradação.

3.5.1 Imersão em fluido corporal simulado (SBF)

A bioatividade dos vidros *in vitro*, refletida na sua capacidade de induzir a formação de HA na sua superfície, foi investigada através da imersão dos pós em fluido corporal simulado. Para isso foi necessária a preparação da solução com a concentração de íons semelhante á do plasma sanguíneo humano. Para preparar 1 L de solução colocaram-se cerca de 500 mL de água desionizada num recipiente de vidro sob agitação. De seguida foram adicionados os reagentes pela ordem especificada na tabela abaixo, segundo Tas *et al.* [70].

Tabela 5 - Ordem, fórmula química, quantidade, marca e pureza dos reagentes para 1L de SBF.

Ordem	Reagente	Quantidade	Marca	Pureza (%)
1	NaCl	6, 547g	Fluka BioChemika	$\geq 99,5$
2	NaHCO_3	2,268g	Aldrich	99,7

3	KCl	0,373g	Aldrich	99
4	Na ₂ HPO ₄	0,141g	Merck	≥99
5	MgCl ₂ .6H ₂ O	0,305g	Aldrich	99
6	HCl 1N	15mL	Aldrich (Solução preparada no laboratório)	
7	CaCl ₂ .6H ₂ O	0,548g	Merck	97
8	Na ₂ SO ₄	0,071g	Aldrich	99
9	(CH ₂ OH) ₃ CN H ₂	6,057g	Aldrich	≥99,8

Por fim, adicionou-se HCl até se obter uma solução com um pH de aproximadamente 7,25. A solução foi transferida para um balão volumétrico de 1000 mL e adicionou-se água desionizada a fim de perfazer 1 L de solução requerido.

Para a imersão os pós foram colocados em frascos de plástico esterilizados, sendo utilizado para 0,1 g de pó 50 mL de solução. Os frascos foram mantidos numa estufa a 37 °C sob rotação (120 rpm). Para cada pó foram testados vários tempos, entre 1 h e 7 dias, sendo que a solução foi renovada a cada 48 h. Os experimentos foram feitos em duplicado por forma a garantir uma maior exatidão dos resultados e assim verificar a repetibilidade destes.

Ao fim de cada tempo (1, 3 e 12h e 1, 3 e 7 dias) os pós foram separados da solução e colocados a secar para posterior análise por DRX e FTIR.

3.5.2 Testes de degradação

Estes testes foram realizados com o objetivo de apurar o grau de dissolução dos vidros em estudo tendo em conta as suas composições, assim como o seu efeito ao nível do pH do meio. Foram realizados de acordo com a norma ISO 10993-14: “Avaliação biológica de dispositivos médicos – Parte 14: Identificação e quantificação dos produtos de degradação dos cerâmicos”.

A solução utilizada para simular o pH existente *in vivo* foi uma solução tampão de Tris-HCl. Para a preparação da solução referida foram dissolvidas 13,25 g de Tris em 500 mL de água desionizada num recipiente de vidro de 1000 mL, sob agitação. De seguida foi adicionado HCl 1N (solução preparada no laboratório) por forma a obter um pH de aproximadamente 7,25. A solução foi transferida para um balão volumétrico de 1000 mL e adicionou-se água desionizada até perfazer 1 L de solução. Por fim mediu-se o pH final.

Os vidros foram utilizados na forma de partículas com tamanhos na gama entre 300–425 μm . Para o efeito, as fritas foram esmagadas num almofariz metálico e depois passadas através de peneiros adequados de forma a obter partículas dentro da gama de tamanhos acima referida.

Os frascos utilizados foram esterilizados e pesados antes da colocação dos materiais por forma a facilitar a medição da perda de peso após os testes. Em cada frasco foram adicionados 2,5 g de partículas e 50 mL de solução (20 vezes mais o peso das partículas). Os frascos foram mantidos numa estufa a 37 °C sob rotação (120 rpm). A solução foi mantida durante 5 dias em que decorreram os testes, tendo o pH sido medido ao longo deste período, nomeadamente, ao fim de vários tempos (1, 3, 6 e 12 h, e 1, 2, 3, 4 e 5 dias). Os experimentos foram feitos em duplicado por forma a garantir uma maior exatidão dos resultados.

Após os 5 dias de teste, as partículas foram separadas das soluções através de filtros. As amostras sólidas foram lavadas com água desionizada e colocadas a secar. A percentagem relativa de perda de peso das amostras foi calculada através da equação seguinte:

$$W_L = \frac{(W_0 - W_t)}{W_0} \times 100$$

Nesta equação, W_0 refere-se ao peso do vidro antes da imersão e W_t ao peso do vidro após imersão.

As soluções recolhidas foram analisadas por espectrometria de emissão ótica por plasma de acoplamento indutivo (ICP) por forma a efetuar a medição das concentrações iónicas dos elementos presentes.

O material final, depois de seco e pesado foi também analisado através de DRX e FTIR.

3.6 Estudos *in vivo*

Os estudos *in vivo* foram realizados em dois carneiros saudáveis e esqueleticamente maduros, com um peso médio de 50 kg. Foram tomadas as medidas adequadas para minimizar a dor e o desconforto dos animais de acordo com os procedimentos aprovados pela Direção Geral de Veterinária de Portugal, plasmados na diretiva 86/609/EEC do Conselho Europeu de Comunidades e pela Comissão de Ética do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto.

Os procedimentos cirúrgicos foram conduzidos sob anestesia geral e foi administrada uma associação de penicilina e estreptomicina antes da cirurgia para proporcionar uma cobertura antibiótica.

Três placas de cada vidro bioativo, no total de 9, foram implantadas subcutaneamente no dorso de cada animal com vista a avaliar a biocompatibilidade dos materiais. Amostras dos vidros bioativos na forma de pós foram também implantadas em defeitos ósseos criados na cortical da diáfise femural de cada animal para testar a bioatividade e a regeneração óssea induzida pelos materiais.

Após a cirurgia e recuperação da anestesia, os animais foram transferidos para jaulas individuais e foi mantida uma terapia antibiótica durante a primeira semana com administrações intramusculares diárias de uma associação de penicilina com estreptomicina.

Os carneiros foram sacrificados após 1 mês e o material recolhido foi radiografado e posteriormente fixado em formol para posterior análise histológica por microscopia ótica e microscopia eletrônica de varrimento (SEM).

3.6.1 Biocompatibilidade dos materiais

Os materiais sintéticos, neste caso vidros bioativos com diferentes composições, quando implantados no organismo podem provocar uma reação tecidual adversa sendo assim possível determinar a sua biocompatibilidade nos tecidos hospedeiros. Os implantes subcutâneos das composições em estudo, em forma de placas colocados no dorso dos animais visaram avaliar este tipo de reações.

As placas foram cortadas de provetes de vidro vazados na forma de barras, obtido por vazamento dos fundidos em moldes metálicos usando uma máquina de corte (Struers Secotom com disco diamantado a velocidade de rotação de 3000 rpm). As placas cortadas foram polidas de ambos os lados, inicialmente com uma lixa P600, e posteriormente com pastas de diamante de 9 μm e uma de 6 μm) de forma a obter superfícies lisas. Antes da implantação as amostras foram esterilizadas através da utilização de radiação gama. Cirurgicamente foram abertas 4 bolsas do lado esquerdo e 5 bolsas do lado direito do dorso, e os implantes foram inseridos segundo o esquema indicado na Figura 7.

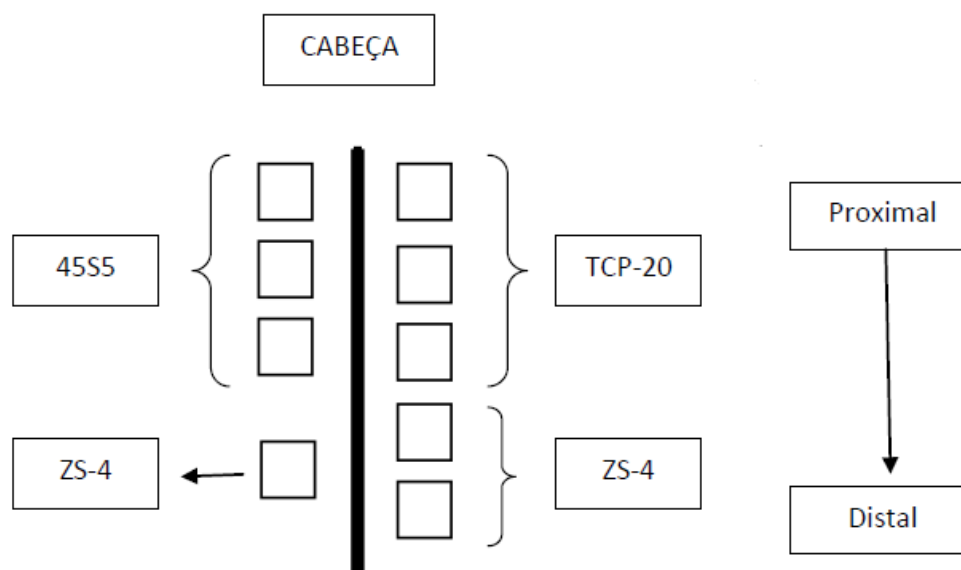


Figura 7 - Esquema representativo da localização dos implantes subcutâneos.

3.6.1.1 Análise histológica

Após a remoção dos implantes subcutâneos, as amostras de tecido foram rotineiramente processadas e as secções obtidas, com uma espessura de 5 μm , foram coradas com eosina-hematoxilina (HE) para a observação precisa da reação fibrótica em torno das placas dos três vidros bioativos implantados. O processamento das amostras em lâminas possibilitou a avaliação da cápsula fibrosa em volta de cada implante, bem como a averiguação da existência de neovascularização e a contagem de células típicas da reação inflamatória (eosinófilos, linfócitos, células plasmáticas, macrófagos e células gigantes). Todas as observações histológicas foram realizadas num microscópio de luz E600 (Nikon). As amostras foram ainda observadas através do microscópio eletrónico de varrimento (Hitachi modelo S-4100 provido de um sistema de emissões de eletrões com um filamento de tungsténio com potencial de aceleração de 10kV e resolução máxima de 15Å) por forma a verificar as alterações resultantes da implantação, tendo sido por isso comparadas com amostras não implantadas.

3.6.2 Desempenho in vivo dos pós de vidro

Para a avaliação do desempenho dos pós foram criados 5 defeitos ósseos cilíndricos em cada fémur, com aproximadamente 5 mm de diâmetro, perfurados com uma broca adequada através do osso cortical entrando na cavidade medular. Este processo foi acompanhado de uma lavagem contínua com uma solução salina estéril para minimizar os danos térmicos e para remover qualquer resíduo ósseo. Em ambos os fémures, o primeiro defeito foi deixado vazio para servir de controlo. O 2º defeito foi preenchido com o material selecionado como comparador, o biovidro comercial 45S5. Os restantes 3 defeitos foram preenchidos com as composições a testar, o vidro bioativo TCP-20 (fémur direito) e o vidro bioativo ZS-4 (fémur esquerdo). No esquema da Figura 8 é possível verificar a colocação dos pós de biovidro referidas. Os pós dos vidros bioativos foram misturados com soro fisiológico imediatamente antes da sua aplicação para facilitar o preenchimento dos defeitos com o uso de uma seringa adaptada para o efeito. Na Figura 9, é possível ver os defeitos criados vazios (Figura 9 (a)) e o 2º defeito já preenchido com o material (Figura 9 (b)).

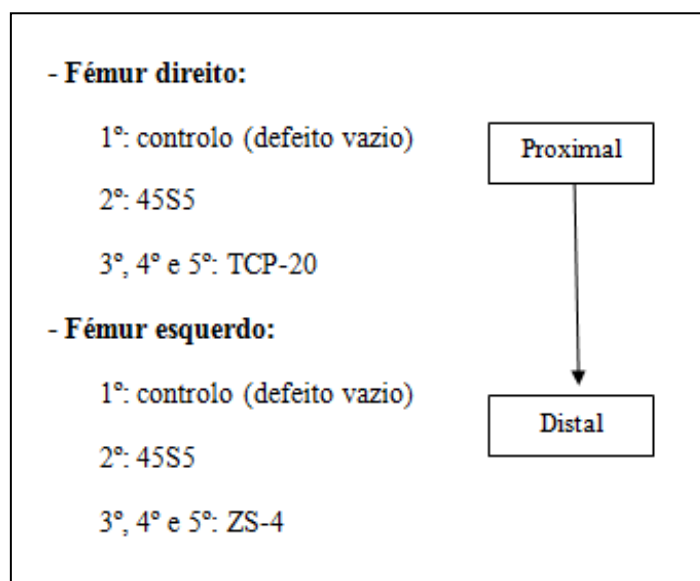


Figura 8 - Esquema da colocação dos póis dos 3 biovidros implantados.

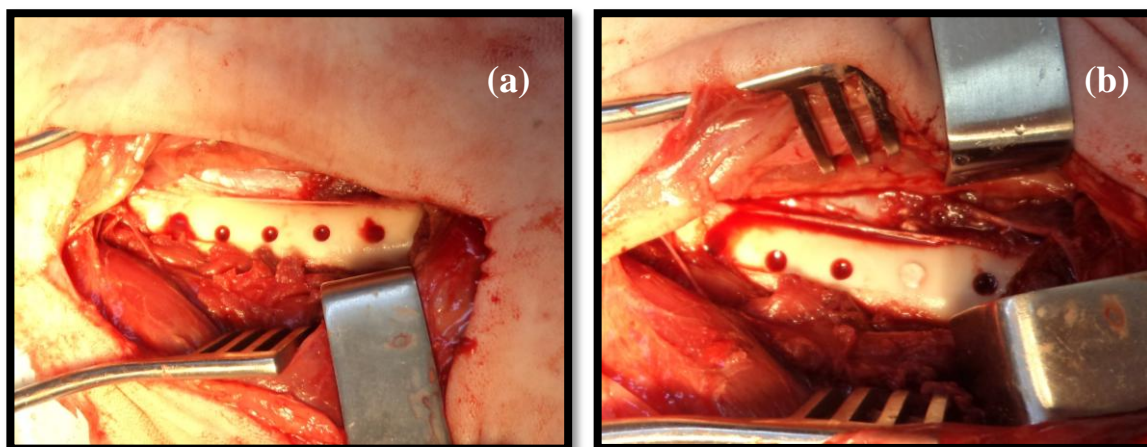


Figura 9 - Colocação dos póis de vidro, (a) defeitos vazios e (b) pó colocado no 2º defeito a contar a direita.

Tendo em conta a duração relativamente longa dos procedimentos relativos ao processamento histológico das amostras de osso recolhidas, os resultados não puderam ser apresentados na presente tese. Estes serão reportados mais tarde na forma de artigos científicos a submeter em revistas da especialidade.

CAPÍTULO 4 - Resultados e Discussão

A escolha das composições vítreas deste estudo foi feita com base nos resultados obtidos em estudos anteriores do sistema diopside ($\text{CaMgSi}_2\text{O}_6$) - fluorapatite ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$) - fosfato tricálcico ($3\text{CaO}\cdot\text{P}_2\text{O}_5$) [5,6,52]. Ambas as composições, TCP-20 e ZS-4, foram anteriormente caracterizadas e estudadas *in vitro* mas as interações com os tecidos vivos não tinham sido investigadas, sendo esse o objetivo principal da presente tese. Além disso, foram aprofundados os estudos *in vitro* dos materiais de forma a complementar os dados anteriormente recolhidos e testar a adequação da escolha destas composições específicas de vidros bioativos.

4.1 Caracterização dos materiais

Os vidros bioativos foram caracterizados através das várias análises e os resultados obtidos foram comparados com os de estudos semelhantes realizados com o material escolhido como comparador, a composição 45S5 Bioglass[®].

4.1.1 Tamanho médio de partícula

As distribuições de tamanhos de partículas dos pós dos vidros bioativos moídos, entre as frações em volume de 10–90% das partículas abaixo de um certo diâmetro, variaram entre as gamas seguintes: 1,49–63,1 μm para o TCP-20, 1,03–50,9 μm para o ZS-4 e 1,45–45,9 μm para o 45S5 Bioglass[®]. Os tamanhos médios de partícula medidos foram aproximadamente de 20–24 μm para o TCP-20, 18–21 μm para o ZS-4, e de 17–21 μm para o 45S5 Bioglass[®]. A Figura 10 apresenta as curvas de frequência de tamanho de partícula para cada composição, obtidas por análise granulométrica.

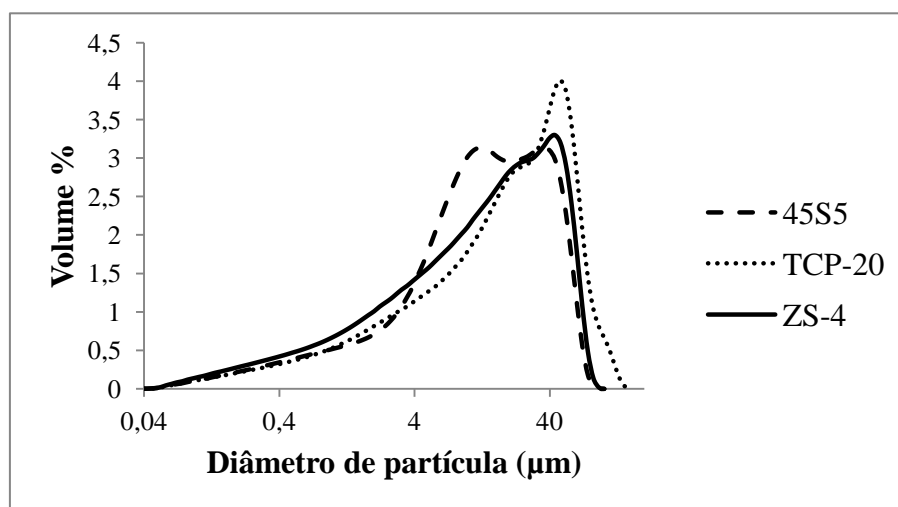


Figura 10 - Distribuição do tamanho de partícula para as três composições (45S5 Bioglass®, TCP-20 e ZS-4).

Pode verificar-se que as curvas obtidas não diferem muito entre si. As das duas composições em estudo aproximam-se mais de distribuições unimodais, enquanto a do 45S5 Bioglass® tende a mostrar duas populações de partículas algo sobrepostas. Estas diferenças, não sendo significativas para os objetivos da presente tese, podem estar relacionadas com a composição deste biovidro, que possui um elevado teor de óxido de sódio (24,5% em peso). Este componente tende a aumentar o coeficiente de dilatação térmica dos vidros, o qual pode originar um choque térmico mais acentuado aquando da preparação da frita e determinar tensões termomecânicas mais elevadas e assim levar a um comportamento diferente na moagem.

4.1.2 Análise cristalográfica das fritas moídas

Os difratogramas de raios-X correspondentes às três fritas moídas, TCP-20, ZS-4 e 45S5 Bioglass®, estão apresentados nas Figuras 11. É assim possível verificar a natureza amorfa das composições em estudo depois deste tratamento.

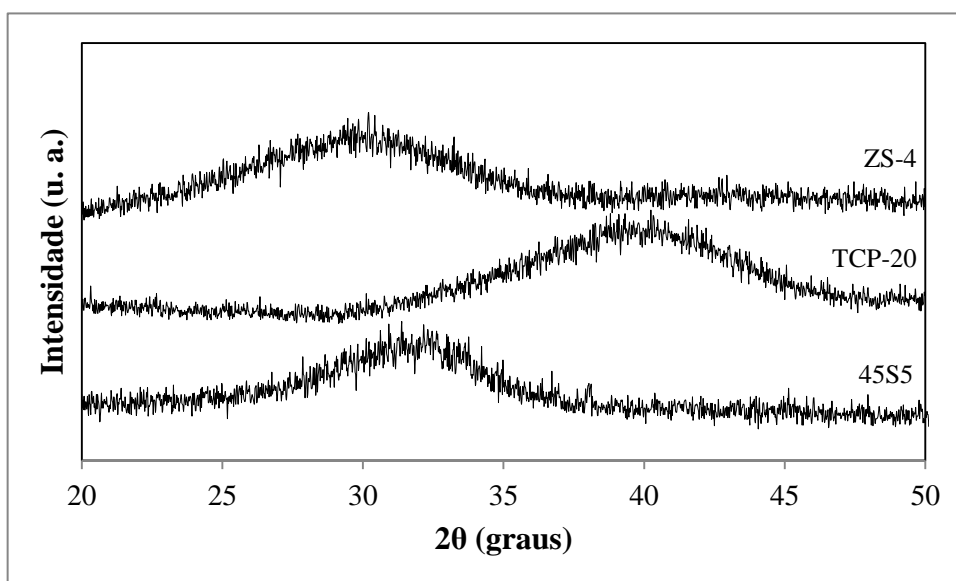


Figura 11 - Difrátogramas de raios-X dos três vidros (45S5 Bioglass[®], TCP-20 e ZS-4).

4.1.3 Grupos funcionais

Os espectros de FTIR dos biovidros estão representados na Figura 12. A inexistência de picos bem definidos é indicativa da desorganização geral da rede vítrea. É possível verificar a existência de três bandas principais de transmitância.

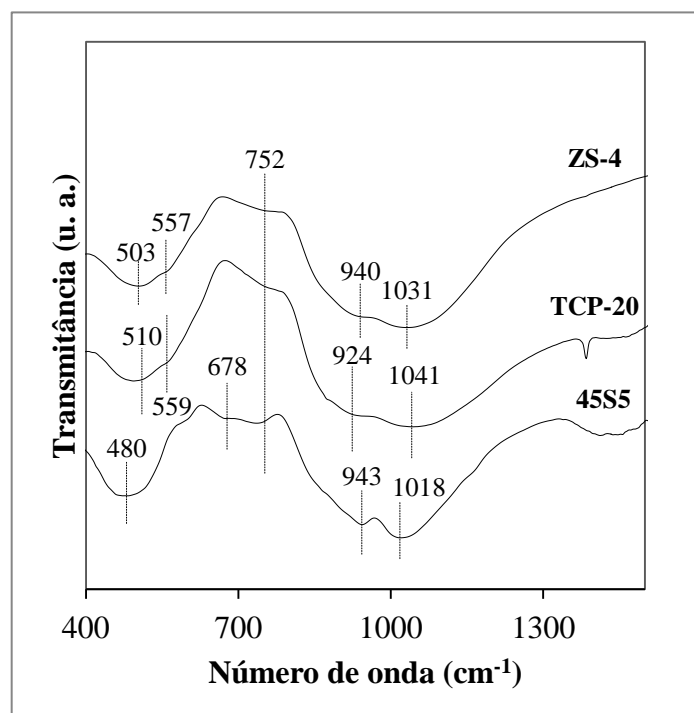


Figura 12 - Espectros de FTIR dos três vidros (45S5 Bioglass[®], TCP-20 e ZS-4).

As bandas presentes na região 415–540 cm^{-1} correspondem à flexão das cadeias de sílica enquanto as bandas da região 710–1300 cm^{-1} estão relacionadas com o estiramento do tetraedro de SiO_4 com um número variável de oxigénios ligantes. É importante referir que nesta mesma região podem existir bandas correspondentes ao estiramento de PO_4^{3-} (entre 900–970 cm^{-1} e 1000–1100 cm^{-1}) devido à presença de P_2O_5 nas composições em estudo. As bandas que se encontram entre 550–560 cm^{-1} e que estão presentes nos vidros TCP-20 e ZS-4 correspondem ao fósforo amorfo que existe em maiores quantidades nestas composições comparando com o 45S5 Bioglass[®] [5,76–78].

4.1.4 Unidades estruturais determinadas por NMR

Os resultados das análises por ressonância magnética nuclear realizados às duas composições de vidros bioativos em estudo estão apresentados na Figura 13. A sua observação permite verificar a predominância de unidades estruturais Q^2 no espetro ^{29}Si . Os picos relativamente alargados são característicos de estruturas desorganizadas, típicas dos materiais vítreos. As diferenças entre as duas composições não são significativas, sendo que a adição de zinco e estrôncio causou apenas uma ligeira mudança na posição do pico, de -80,5 ppm para -81,5 ppm, não havendo por isso alterações significativas na coordenação do silício na estrutura do vidro [6,52]. Apesar disso, o desvio químico que se verifica pode ser devido ao aumento da polimerização da rede correspondente à adição de zinco e estrôncio na composição [5]. O vidro bioativo 45S5 Bioglass[®] possui características estruturais semelhantes, uma vez que as unidades estruturais predominantes são do tipo Q^2 , assim como acontece com as composições em estudo [79]. Como já foi referido na revisão bibliográfica da presente tese, é de esperar que biovidros com a predominância de estruturas do tipo Q^2 sejam mais bioativos, sendo de esperar uma certa interdependência entre a estrutura vítrea e a bioatividade.

No espetro ^{31}P as diferenças entre as composições também não são significativas, os desvios químicos estão situados entre 2,2 ppm e 2,5 ppm, sendo possível afirmar a predominância do ambiente tipo ortofosfato. Os desvios químicos dentro do intervalo de 1 a 3 ppm, são próximos do ortofosfato de cálcio (3,1 ppm) [5]. Mais uma vez, o vidro

bioativo 45S5 Bioglass[®] é semelhante às duas composições, relativamente à predominância do ambiente tipo ortofosfato [32,79].

O estudo dos efeitos da adição separada de zinco ou de estrôncio à composição base TCP-20 não revelaram diferenças muito significativas em termos de unidades estruturais predominantes e de conectividade da rede dos vidros [5,6,52].

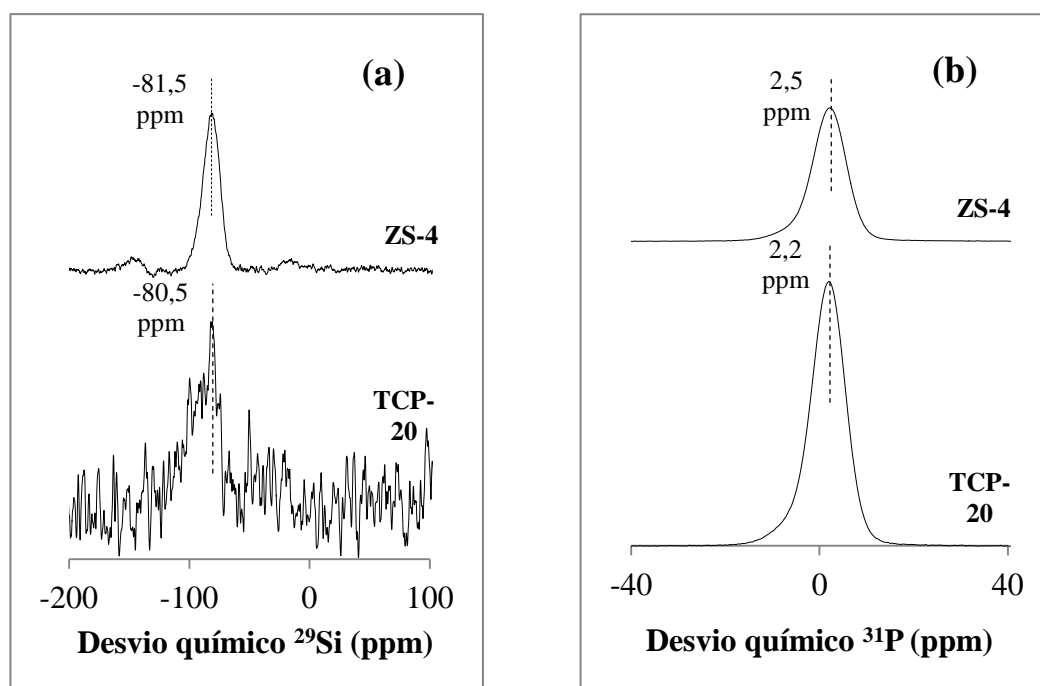


Figura 13 - Espectros NMR para os vidros TCP-20 e ZS-4, (a) espectro ^{29}Si e (b) espectro ^{31}P .

4.2 Ensaios *in vitro*

4.2.1 Imersão em fluido corporal simulado (SBF)

A bioatividade dos vidros reflete a sua capacidade de induzir a formação de HCA na sua superfície. Através da difração de raios-X é possível apurar se ocorre o aparecimento das fases cristalinas de HA após os vários tempos de imersão em SBF. Os difratogramas obtidos ao fim de tempos de imersão diferentes, para os biovidros TCP-20 e ZS-4, estão apresentados na Figura 14 e 15, respetivamente, em conjunto com as linhas de difração do padrão de HA.

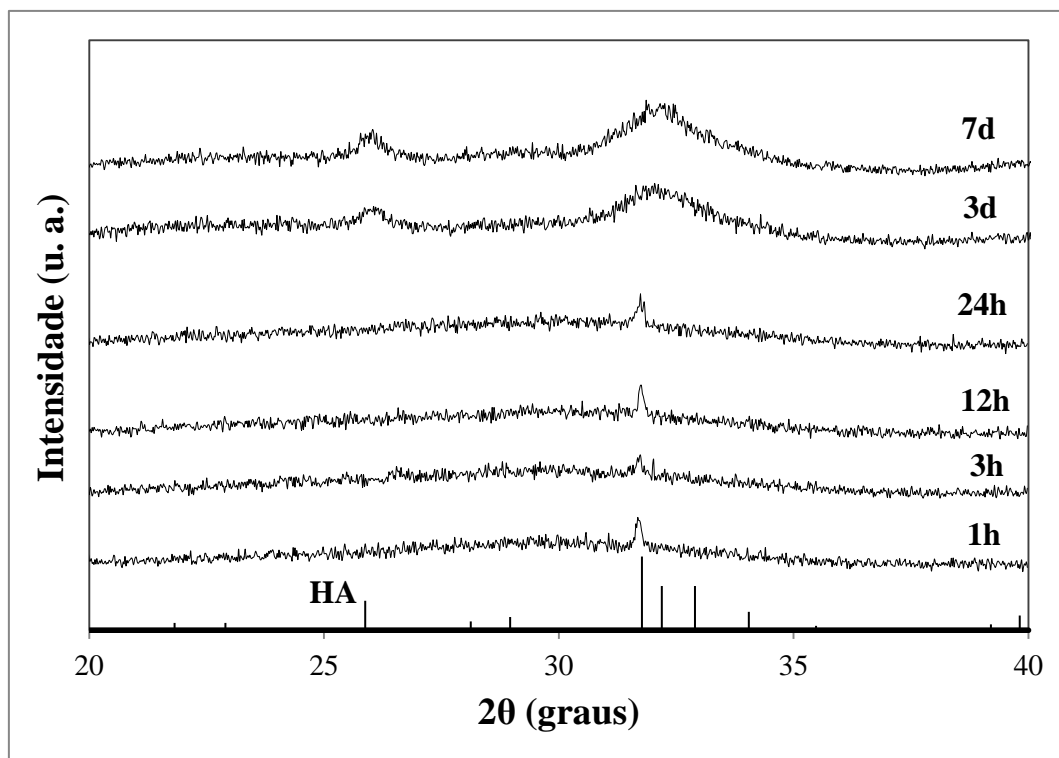


Figura 14 - Difratomogramas após imersão em SBF do biovidro TCP-20.

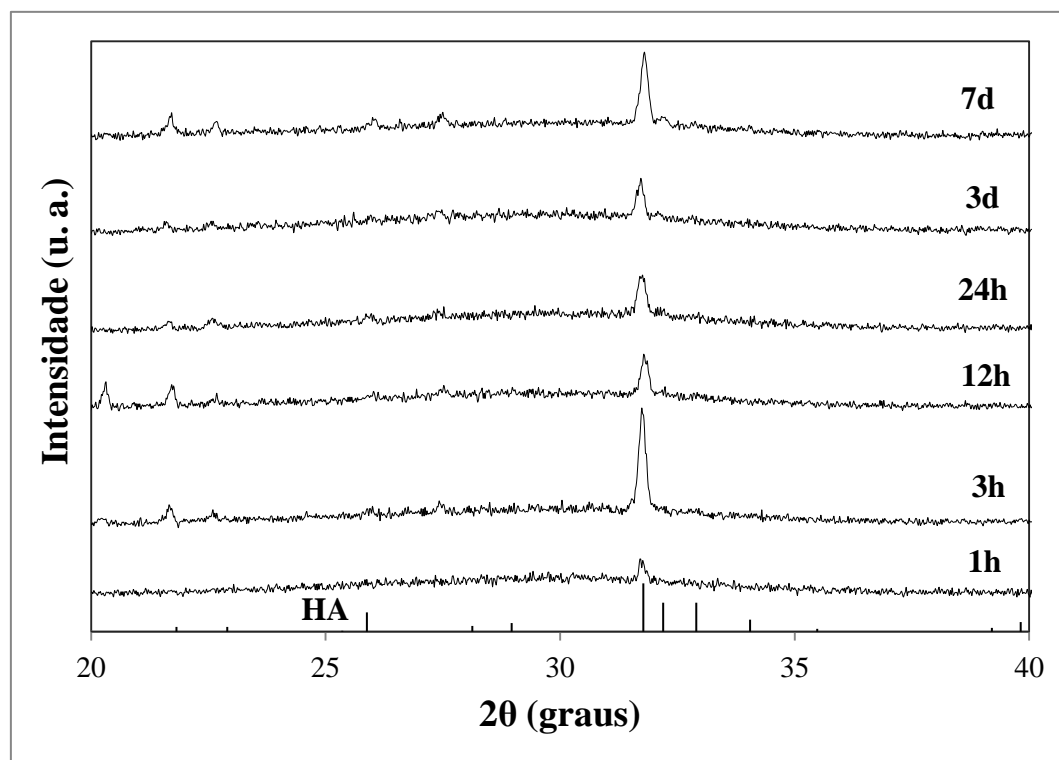


Figura 15 – Difratomogramas após imersão em SBF do biovidro ZS-4.

Verifica-se que, para ambas as composições em estudo, os picos de HA aparecem ao fim de tempos de imersão claramente curtos, uma vez que, apenas com 1 hora de imersão é possível observar-se o pico característico de maior intensidade do padrão de difração da HA ($2\theta=31,77^\circ$).

No caso do TCP-20 o pico referido mantém-se até às 24 horas de imersão, sendo que a sua intensidade varia ligeiramente, apesar de não serem diferenças significativas. Após 3 dias é clara a existência de dois picos característicos da fase HA, mantendo-se ao fim dos 7 dias de teste.

Já no caso do ZS-4, o mesmo pico de HA já referido, a $2\theta=31,77^\circ$, mantém-se durante todos os tempos investigados. Comparando com o TCP-20, é de notar que a intensidade do pico é mais elevada no ZS-4, o que pode estar relacionado com um aumento aparente da bioatividade, obtido através da adição de zinco e estrôncio à composição base (TCP-20). É possível ainda verificar a existência de dois picos de menor intensidade, também pertencentes ao padrão de difração da HA ($2\theta=21,82^\circ$ e $2\theta=22,90^\circ$), ao longo dos vários tempos testados.

Para ambas as composições, a renovação do fluido, de 48 em 48 horas, não afetou a natureza da camada depositada, embora se verifiquem algumas variações não sistemáticas na intensidade dos picos. Estas variações podem ser devidas a fatores experimentais relacionados com a quantidade de amostra ou o modo como foi empacotada, etc..

No caso da composição 45S5 Bioglass[®], cujos difratogramas estão apresentados na Figura 16 abaixo, a fase cristalina detetada após todos os tempos de imersão inferiores a 7 dias é a calcite (C), com o pico característico de maior intensidade a $2\theta=29,49^\circ$. Uma banda larga coincidente com os picos característicos da hidroxiapatite só aparece após 7 dias de imersão. A formação de calcite e não de HA pode ser explicada através do aumento de pH provocado pela dissolução parcial do 45S5 Bioglass[®], como se verificou nos testes de degradação *in vitro* discutidos mais abaixo na secção 4.2.2 da presente tese.

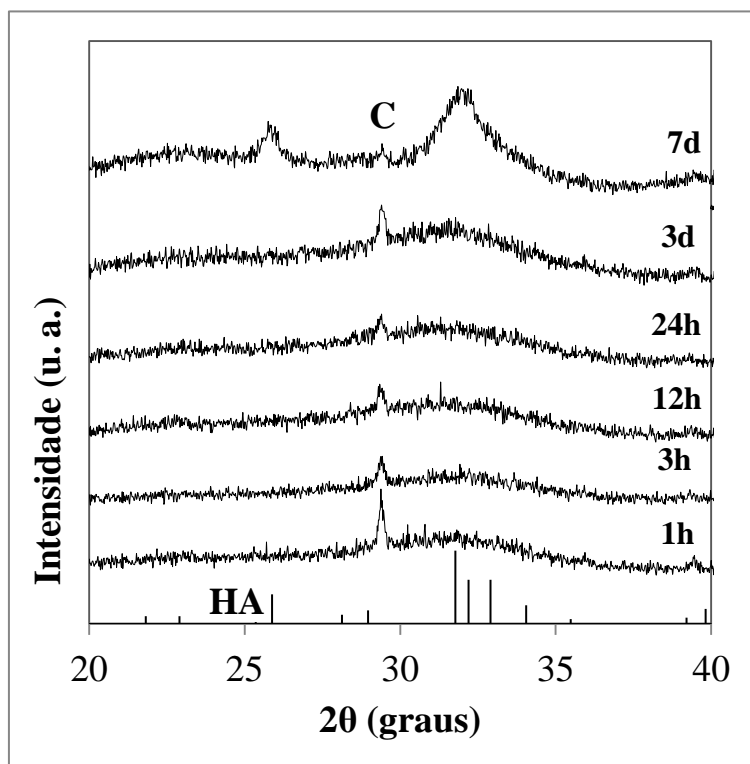


Figura 16 - Difrátogramas após imersão em SBF do biovidro 45S5 Bioglass®.

Estes resultados permitem concluir que as composições em estudo são melhores no que diz respeito à capacidade de biomineralização, uma vez que a HA é formada mais rapidamente quando em contato com o fluido corporal simulado.

Os efeitos dos testes de biomineralização *in vitro* foram também avaliados por FTIR para determinar os seus grupos funcionais formados durante a imersão em SBF, bem como o modo como se alteram ao longo do tempo.

Os espectros de FTIR das amostras de TCP-20 imersas por períodos de 1 hora a 7 dias estão apresentados no gráfico da Figura 17. Durante as primeiras 24 horas de imersão, é possível verificar a existência de 6 bandas principais de transmissão. A banda a $\sim 464\text{ cm}^{-1}$ corresponde ao modo de deformação da camada de sílica que se desenvolveu sobre a superfície lixiviada, mantendo-se após os 7 dias de teste ($\sim 468\text{ cm}^{-1}$ para 3 e 7 dias) [5]. A banda a $\sim 560\text{ cm}^{-1}$, que também se mantém após os 7 dias de imersão ($\sim 566\text{ cm}^{-1}$) é a região mais característica para a apatite e outros fosfatos pois corresponde às vibrações de

flexão das ligações P-O no tetraedro PO_4^{3-} . Usualmente os grupos PO_4^{3-} apatíticos possuem bandas características a ~ 560 e $\sim 600 \text{ cm}^{-1}$ com um terceiro sinal a $\sim 575 \text{ cm}^{-1}$ para cristalites de menor tamanho. Uma vez que nesta região, apenas se verifica a existência da banda a $\sim 560 \text{ cm}^{-1}$, esta sugere a presença de fosfato de cálcio não apatítico ou amorfo, o que usualmente é tido como indicação da presença de precursores da HA [5]. A banda mais intensa a $\sim 1068 \text{ cm}^{-1}$ com um ombro fraco a $\sim 1240 \text{ cm}^{-1}$ corresponde a vibrações das ligações Si-O-Si, indicando que o desenvolvimento da camada de sílica gel ocorreu de acordo com o esquema postulado por Hench [4], e é visível para os 7 dias de teste. A pequena banda a $\sim 1428 \text{ cm}^{-1}$ ($\sim 1424 \text{ cm}^{-1}$ para 3 e 7 dias) e a banda a $\sim 874 \text{ cm}^{-1}$ correspondem à incorporação de carbonato na apatite, o que levará à formação de hidroxiapatite carbonatada (HCA) em vez de hidroxiapatite estequiométrica [5,76,77].

As bandas a $\sim 800 \text{ cm}^{-1}$ e $\sim 950 \text{ cm}^{-1}$ visíveis a 12 horas e 24 horas de imersão correspondem às vibrações de flexão das cadeias Si-O-Si da camada de sílica gel formada e às vibrações de estiramento das ligações P-O, respetivamente. Estas bandas mantêm-se presentes após os 7 dias de imersão, sendo que se verifica um ligeiro desvio de $\sim 950 \text{ cm}^{-1}$ para 962 cm^{-1} , correspondendo na mesma às vibrações de estiramento das ligações P-O. É necessário ter em conta que as bandas a $\sim 950 \text{ cm}^{-1}$ e a $\sim 962 \text{ cm}^{-1}$ podem também corresponder às vibrações de estiramento dos grupos silanol (Si-OH) formados aquando das reações de troca dos iões modificadores da rede do vidro com os iões H^+ (ou H_3O^+) da solução, como descrito por Hench [4] como sendo a 1ª etapa do processo de ligação do vidro [77].

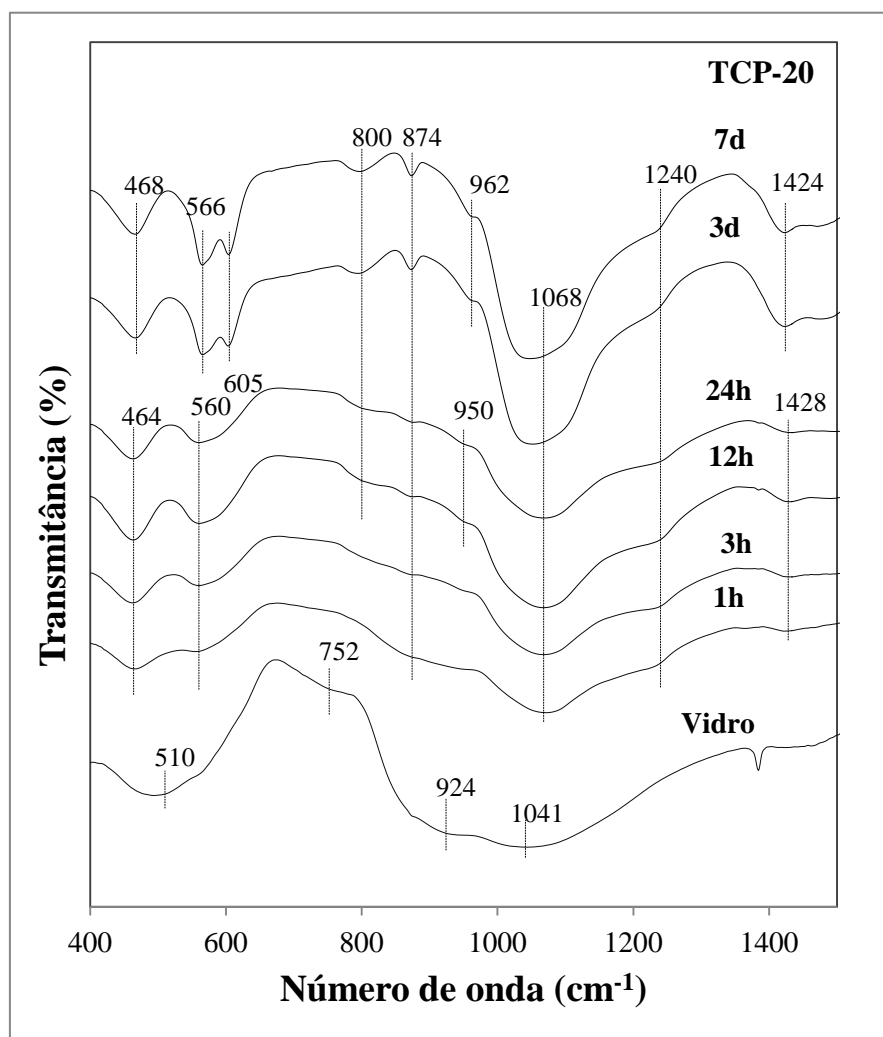


Figura 17 - Espectros de FTIR do biovidro TCP-20 antes e após imersão em SBF.

Os espectros de FTIR das amostras do vidro bioativo ZS-4 apresentados no gráfico da Figura 18 dão conta das alterações ocorridas ao longo dos vários períodos de imersão em SBF. Nas 3 primeiras horas de imersão é possível verificar a existência de uma banda a $\sim 503\text{ cm}^{-1}$, banda essa característica do vidro, e que corresponde às vibrações dos grupos de Si-O-Si. A partir das 12 horas de imersão e até aos 7 dias de teste esta banda altera-se para $\sim 474\text{ cm}^{-1}$, sendo característica do modo de deformação da camada de sílica gel que se desenvolveu sobre a superfície lixiviada. As bandas a $\sim 561\text{ cm}^{-1}$, $\sim 599\text{ cm}^{-1}$, $\sim 626\text{ cm}^{-1}$ e $\sim 1035\text{ cm}^{-1}$, praticamente presentes em todos os tempos de imersão, ou com pequenos desvios, são características da hidroxiapatite e de outras espécies de fosfato cristalinas,

uma vez que correspondem a vibrações de flexão P-O no tetraedro PO_4^{3-} . Além disso, as bandas principais a cerca de $\sim 1051\text{-}1060\text{ cm}^{-1}$ podem ser atribuídas às vibrações de estiramento dos grupos Si-O-Si, podendo também resultar da formação da camada de sílica gel, como postulado por Hench [4]. Por fim, as bandas entre 1294 cm^{-1} e 1465 cm^{-1} correspondem à formação de espécies carbonatadas complexas. Estes resultados suportam a hipótese de formação de HCA durante os testes de biomineralização *in vitro* [5,6,52,76,77,80,81].

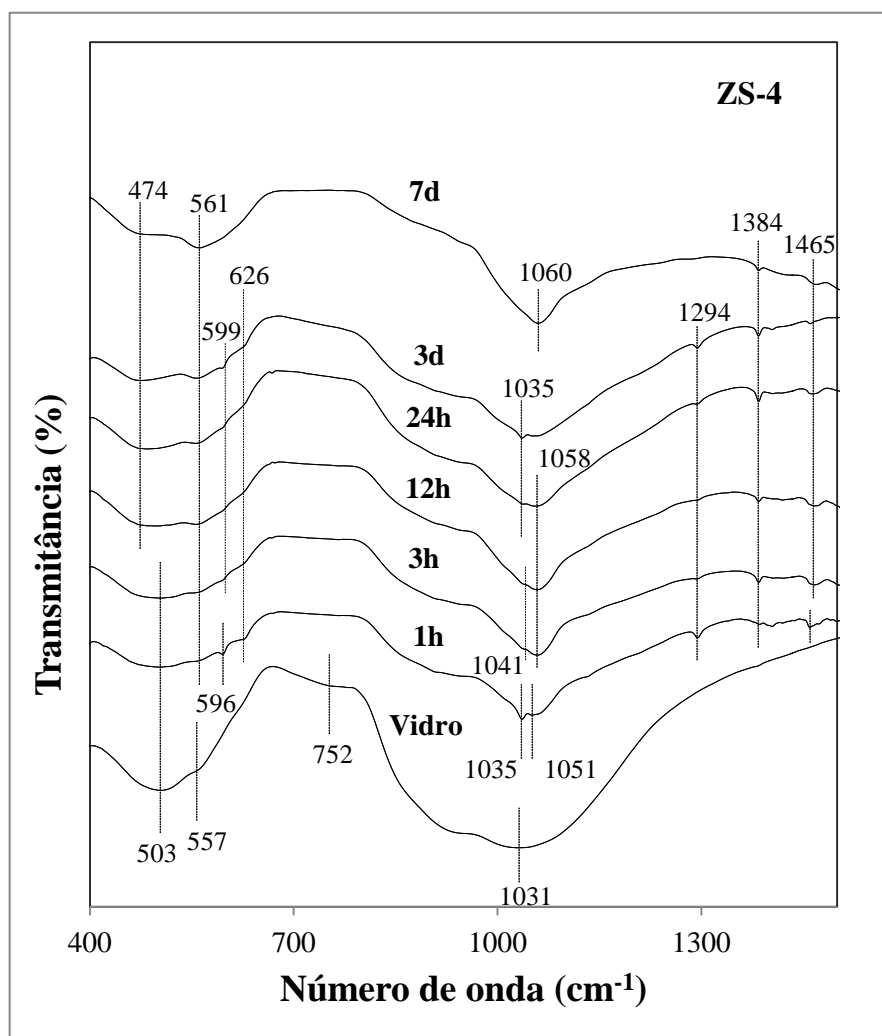


Figura 18 - Espectros de FTIR do biovidro ZS-4 antes e após imersão em SBF.

Por fim, o espectro de FTIR da composição 45S5 Bioglass[®] está apresentado no gráfico da Figura 19. Após a primeira hora de imersão, é possível verificar a existência de

uma banda a $\sim 466\text{ cm}^{-1}$ que corresponde ao modo de deformação da camada de sílica que se desenvolveu sobre a superfície lixiviada das partículas de vidro. Esta banda está presente até aos 7 dias de imersão. A banda a $\sim 550\text{ cm}^{-1}$ corresponde às vibrações de flexão do tetraedro PO_4^{3-} . As bandas a $\sim 568\text{ cm}^{-1}$ e a $\sim 607\text{ cm}^{-1}$ correspondem a vibrações de flexão das ligações P-O. Tendo em conta a ausência de picos de DRX correspondentes à HA, estes resultados sugerem a formação de precursores de HA amorfos. A banda a $\sim 714\text{ cm}^{-1}$ corresponde ao modo de vibração do tetraedro de silício bem como a banda a $\sim 1076\text{ cm}^{-1}$ e o respetivo ombro a $\sim 1238/1243\text{ cm}^{-1}$, presentes durante todo o tempo de imersão. As bandas a $\sim 873\text{ cm}^{-1}$ e $\sim 1423\text{ cm}^{-1}$ também se encontram em todos os tempos de imersão e correspondem a grupos carbonato, associados à calcite, verificado anteriormente por DRX. Ao longo dos vários tempos de imersão, as variações das bandas não são significativas, sendo que a 7 dias, e visto que através do DRX é confirmada a presença de HA, as bandas $\sim 568\text{ cm}^{-1}$ e $\sim 605\text{ cm}^{-1}$ podem agora ser representativas de HA e de outras espécies de fosfato cristalinas. As bandas a $\sim 715\text{ cm}^{-1}$ e a $\sim 806\text{ cm}^{-1}$ podem corresponder ao modo de vibrações de flexão das cadeias Si-O-Si da camada de sílica gel formada [76,77,80,81].

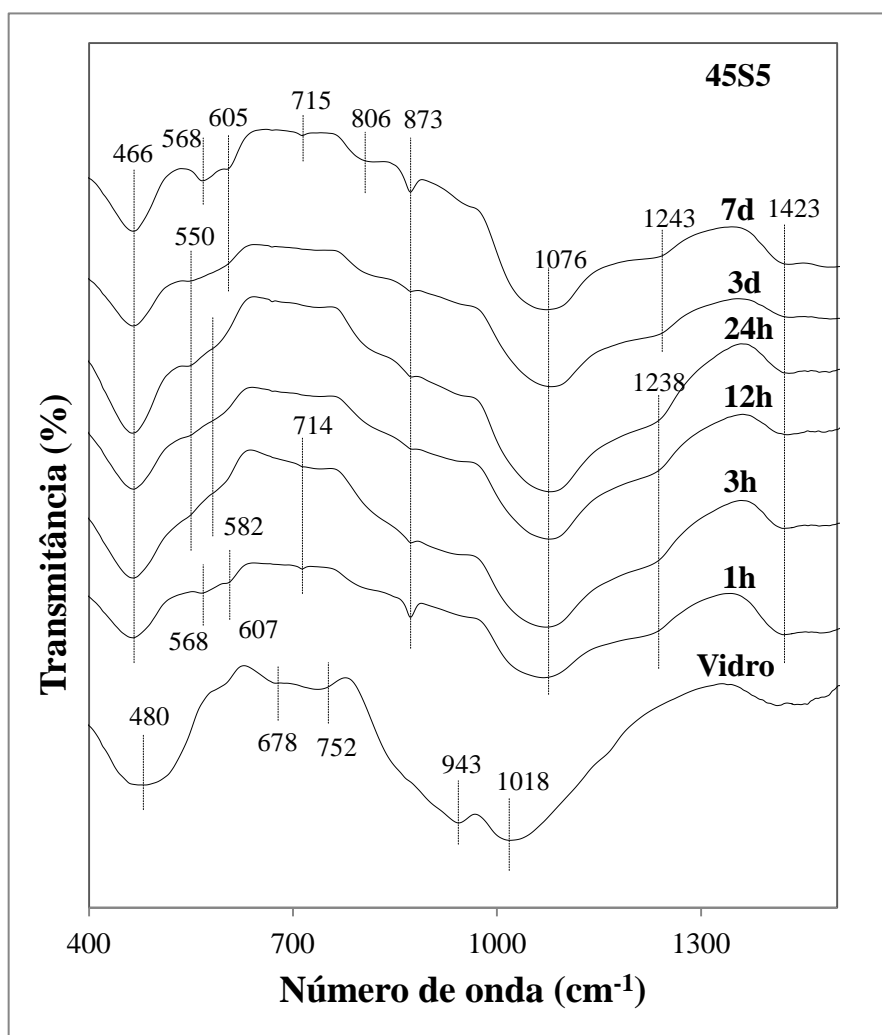


Figura 19 - Espectros de FTIR do biovidro 45S5 Bioglass® antes e após imersão em SBF.

É importante referir que, apesar dos testes de imersão em SBF serem muito úteis para verificar a existência da formação de uma camada de HCA, sabe-se que a deposição de HCA não é o único mecanismo fundamental envolvido na regeneração óssea. Com efeito, os produtos de dissolução iônicos dos vidros bioativos parecem estimular o crescimento e a diferenciação de osteoblastos a nível genético [6]. Assim, uma avaliação mais completa teria de ter em conta as espécies libertadas e as suas concentrações no meio fisiológico. Assim, além dos testes de biomineralização, são essenciais outros estudos de degradação dos materiais para avaliar a aplicabilidade dos vidros bioativos à regeneração óssea.

4.2.2 Testes de degradação

Nos vidros bioativos, tendo vários elementos na sua composição, é muito importante verificar os produtos de dissolução que se libertam durante a degradação do material, além da própria taxa de degradação. A disrupção da rede vítrea e a consequente libertação de certos iões para o meio altera o pH deste, sendo este um dos parâmetros mais importantes no que toca ao desempenho dos materiais em ambiente fisiológicos. No gráfico da Figura 20 apresentada abaixo é possível verificar a evolução do pH ao longo dos 5 dias de duração do estudo, sendo o pH inicial de ~7,25.

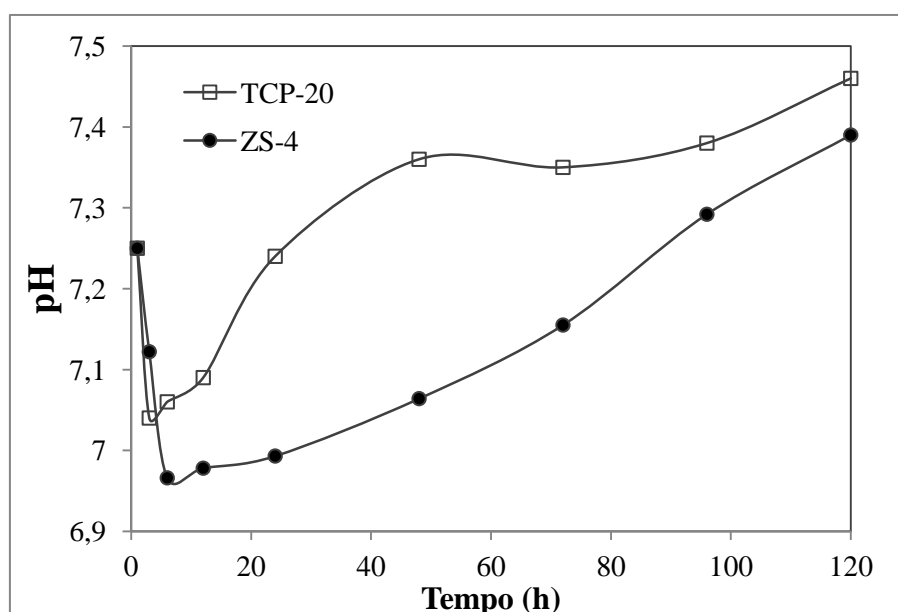


Figura 20 - Curvas de evolução do pH ao longo dos 5 dias de teste.

Como se pode verificar, nas primeiras 3 horas aproximadamente, o pH diminui para ambas as composições. A diminuição foi ligeiramente menor no caso do TCP-20. Ambas as composições atingiram um pH final ao fim de 5 dias de ~7,5, sendo que o do TCP-20 foi ligeiramente superior. Tendo em conta resultados anteriormente obtidos, sabe-se que no caso do vidro 45S5 Bioglass[®], o pH final obtido em testes de degradação, nas mesmas condições, é de aproximadamente 9,7, o que é explicado pela rápida taxa de dissolução desta composição em relação às duas em estudo [5].

Apesar das diferenças entre as duas composições não serem significativas, verifica-se que o pH do ZS-4 ao longo do tempo é mais baixo. Isto pode ser devido à sua menor taxa de degradação. Sabe-se que a adição de zinco (Zn^{2+}) e estrôncio (Sr^{2+}) não altera significativamente a conectividade da rede vítrea comparando com o TCP-20, uma vez que estes elementos foram incluídos através da substituição parcial de Mg^{2+} e Ca^{2+} , respetivamente. Mas o zinco tem maior tendência para formar ligações não-covalentes Si-O-Zn-O-Si, o que confere maior estabilidade química à matriz vítrea, tal como foi sugerido por Goel et al. [52].

Mais especificamente, quer o Zn quer o Mg estão coordenados com 5 oxigénios não ligantes, a maior parte deles pertencentes a grupos SiO_4 e não a grupos PO_4 . O que acontece é que, ao contrário do magnésio, o zinco forma ligações inter-tetraédricas Si-O-Zn e esta associação do Zn com o Si é mais forte que a ligação Ca-Si, fortalecendo a rede vítrea e tornando-a mais resistente à degradação. Foi também verificado que vidros baseados na composição TCP-20 mas dopados apenas com Zn apresentavam taxas de degradação inferiores quando comparados com a composição base [52].

No caso do ZS-4, e como já foi referido nos resultados obtidos através dos testes em SBF, a formação de HA cristalina ocorre mais rapidamente nesta composição do que na composição base TCP-20. Assim, apesar do Zn ser considerado um intermediário na rede e de a tornar mais resistente à degradação, o Sr possui um forte papel de modificador, e o balanço global parece favorecer a formação de HA [6].

No gráfico da Figura 21 abaixo é possível relacionar os valores de pH final obtidos com a perda de peso de cada vidro ao fim dos 5 dias de estudo. Apesar de se verificar e de já ter sido referido que o pH final do TCP-20 (apresentado como 0, por não ter zinco nem estrôncio) é ligeiramente mais elevado do que o do ZS-4 (apresentado como 4). Este último apresenta uma maior perda de peso, sendo que as diferenças são mínimas, ou seja, não são muito significativas. Mais uma vez, as diferenças notáveis verificam-se entre os vidros bioativos estudados e o material comparador, o 45S5 Bioglass[®]. Com efeito, a percentagem de perda de peso reportada para a composição 45S5 Bioglass[®] foi de aproximadamente 3,7%, resultado este que está coerente com a concomitante variação de pH (pH final de 9,7). Tem sido reportado na literatura que a reconstrução total do vidro em vidros com silício e fósforo ocorre a um pH de aproximadamente 8. Sabe-se também que a

um pH superior a 8, a precipitação do fosfato de cálcio ocorre imediatamente após a imersão, dificultando assim a libertação posterior de iões do vidro para o meio e favorecendo a formação de calcite (CaCO_3) em comparação com hidroxiapatite. Por este motivo, nos difratogramas obtidos para o 45S5 Bioglass[®] após imersão em SBF verifica-se a formação preferencial da fase cristalina da calcite e não da hidroxiapatite, até 3 dias [5].

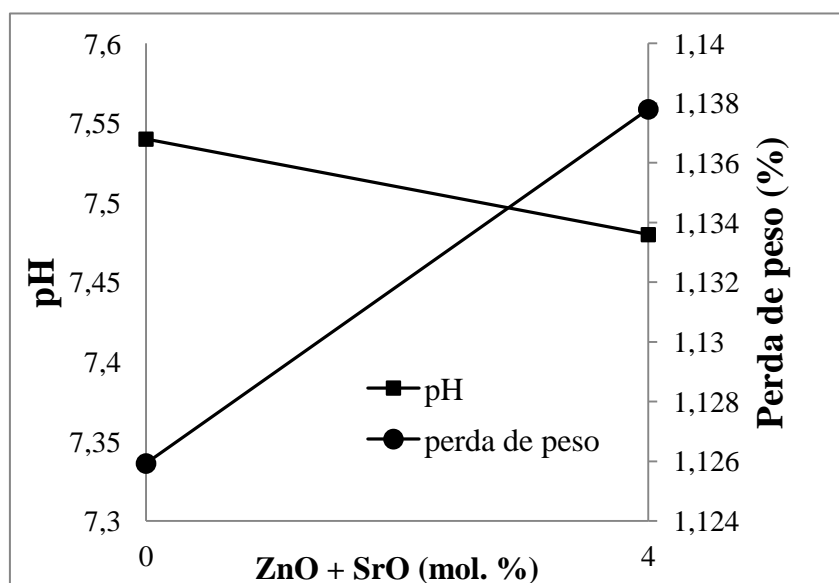


Figura 21 - Representação gráfica dos valores de pH final e da perda de peso final de cada composição.

Comparando as duas composições em estudo, pode verificar-se que a adição de zinco e estrôncio não alterou significativamente as propriedades relativas à degradação do vidro, apesar do que já foi referido anteriormente em relação à evolução do pH. Mas, por outro lado, o ZS-4 além de libertar os iões presentes na composição base, liberta também os iões de zinco e estrôncio para o meio, o que na situação fisiológica, é vantajoso, pois são elementos que possuem um efeito positivo na resposta biológica do sistema ósseo, como já foi referido na revisão bibliográfica da presente tese [6,48,52–57].

Os resultados obtidos por ICP-AES permitiram verificar a libertação de todos os iões (exceto do flúor, uma vez que a energia utilizada por ICP-AES não é suficiente para excitar este elemento e assim analisar a presença deste) na solução final recolhida dos testes de degradação. No gráfico apresentado na figura 22 temos o perfil de libertação de cada ião para as duas composições em estudo [82].

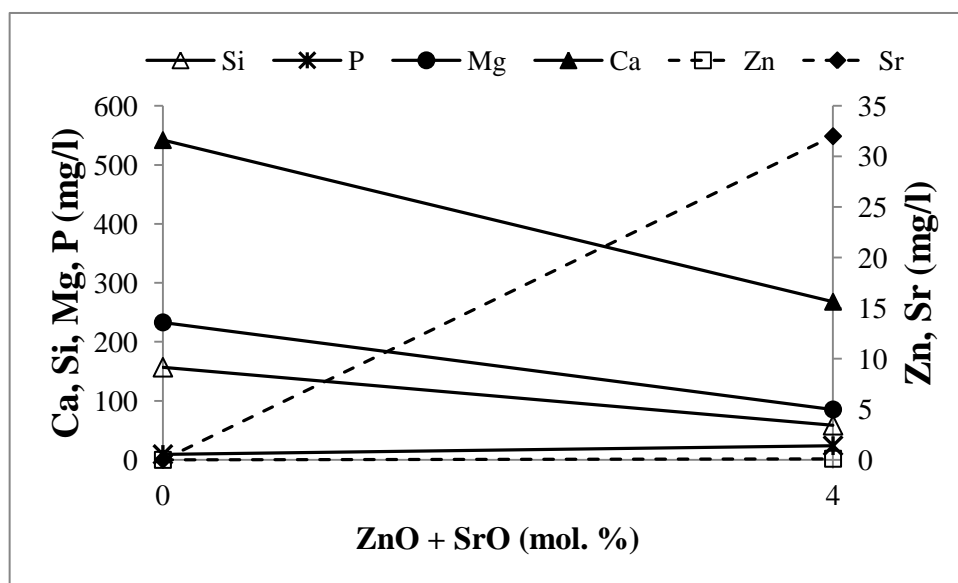


Figura 22 - Perfil de liberação dos elementos presentes nas composições em estudo após o teste de degradação.

Tendo em conta o gráfico apresentado, verifica-se que a liberação de Si diminui com a adição de Zn e Sr, pois, como já foi dito, o ZS-4 degrada-se menos. O mesmo se pode verificar com os níveis de liberação de Mg e de Ca, pois estes encontram-se em menor concentração devido às substituições parciais por Zn e Sr, respetivamente. A liberação de fósforo aumenta com a adição de zinco e estrôncio, uma vez que a adição do segundo elemento referido provoca uma expansão na rede, fazendo com que a fósforo se liberte mais facilmente relativamente à composição sem estrôncio. Relativamente ao zinco e ao estrôncio, este último tem um nível de liberação elevado devido à sua natureza de modificador, enquanto o Zn por estar mais fortemente ligado ao Si, liberta-se em quantidades menores [83].

A liberação de certas quantidades de cada elemento, como já foi referido, possui vantagens para a aplicação destes em vidros bioativos com interesse na regeneração óssea.

Relativamente à liberação de Si^{4+} , estudos anteriores em vidros bioativos mostraram que níveis de liberação na ordem dos 0,1 – 100 ppm possuem efeitos estimulatórios em osteoblastos e na expressão do RNAm da proteína TGF- β em células humanas tipo osteoblastos. Além disso, a utilização de silício tem sido conhecida por evitar a perda de

osso trabecular e sabe-se que uma dieta deficiente em silício resulta numa síntese diminuída de colagénio e numa estrutura esquelética defeituosa. Adicionalmente, a libertação gradual de sílica solúvel com o tempo pode não só aumentar a citocompatibilidade como também pode melhorar a ligação óssea devido ao aumento da formação de grupos silanol (Si-OH), que são conhecidos por desempenhar um papel ativo na precipitação de fosfatos de cálcio, como é o caso da hidroxiapatite [5,6,52]. Como se pode ver pelo gráfico, no caso da composição ZS-4 o valor do ião Si^{4+} está dentro dos valores referidos acima como sendo os valores em que este ião possui propriedades benéficas para vários processos biológicos, o que não se verifica no TCP-20.

No caso do fósforo, a libertação deste em quantidades controladas (<30 ppm) mostrou ser favorável à biomineralização e induz a expressão de transcritos osteogénicos de RNAm enquanto que um aumento da concentração de fósforo acima de 30ppm resulta num decréscimo da viabilidade celular [5,6,52]. Em ambas as composições, a quantidade de fósforo libertado é inferior a 30ppm, sendo que é de 9,2 ppm no TCP-20 e de 24 ppm no ZS-4, pois como já foi dito anteriormente, devido ao efeito da incorporação do estrôncio na estrutura do vidro, a libertação de fósforo é aumentada [83].

Em relação aos níveis de cálcio, quando estes são elevados, no intervalo entre 13,1 e 90 ppm, foi mostrado que este elemento induz a proliferação osteoblástica e a quimiotaxia através da ligação da proteína G acoplada a um recetor sensível ao cálcio, e a sua libertação gradual ao longo do tempo pode melhorar a eficácia terapêutica [5,6,52]. No caso das duas composições em estudo, com a adição de zinco e estrôncio, o nível de cálcio diminui de 542 ppm para o TCP-20 para 268 ppm no caso do ZS-4. Estas diferenças são relativas à menor quantidade de Ca na composição ZS-4, como já foi referido, e também se devem ao facto de esta se degradar menos, libertando assim menos Ca.

Por sua vez, o magnésio apresenta elevados níveis de libertação em ambas as composições, entre 85,4 e 233 ppm o que sendo valores superiores a 25,5 ppm, poderiam levar a paralisia muscular, hipotensão e dificuldades respiratórias e pode ocorrer paragem cardíaca para níveis entre 145 e 170 ppm, mas a incidência de hiper-magnésio é rara devido à excreção eficiente deste elemento pela urina [6].

No caso do zinco, níveis de libertação entre os 2 e os 8 ppm mostraram causar danos em osteoblastos humanos através de stress oxidativo. Foram ainda reportados resultados similares para células endoteliais onde a proliferação celular diminuiu devido às concentrações tóxicas de Zn, de cerca de 2,7 ppm para vidros bioativos dopados com zinco [52]. Na composição ZS-4 em estudo, o nível de Zn encontrado no meio em questão foi de apenas 0,1ppm, não sendo portanto prejudicial.

Por fim, em relação ao estrôncio, foi referido que concentrações entre 8,7 e 87,6 ppm demonstraram efeitos estimulatórios em osteoblastos e mostraram ainda efeitos inibitórios no que diz respeito à ação dos osteoclastos para valores entre os 8,7 e os 2102,8 ppm *in vitro* [6]. Tal como em relação ao zinco, também os níveis de libertação deste elemento se encontram no intervalo ótimo, sendo de 32 ppm.

Apesar de não ter sido analisado o perfil de libertação de flúor, estudos anteriores em vidros bioativos contendo este elemento, mostraram que a adição de flúor possui efeitos vantajosos para aplicação em regeneração óssea uma vez que aumenta a densidade do osso e também atua como agente anti carcinogénico [50,84,85].

Relativamente às alterações decorrentes da degradação dos materiais após os testes, os difratogramas (Figura 23(a)) obtidos permitem confirmar a natureza amorfa dos vidros, não sendo possível verificar a formação de HA. Estes resultados eram esperados pois, como já foi referido na revisão bibliográfica, comparando com o SBF, a solução Tris-HCl, utilizada nos testes de degradação, não é saturada no que diz respeito à HA e, por esta razão, a taxa de deposição desta é muito mais elevada em SBF pois o grau de supersaturação é mais facilmente atingido do que em Tris-HCl. Os espectros de FTIR (Figura 23(b)) obtidos, também permitem verificar que não ocorreram grandes alterações na estrutura dos vidros, sendo que foram menores no ZS-4. Estas alterações são representativas da degradação que ocorreu após 5 dias de imersão em Tris-HCl.

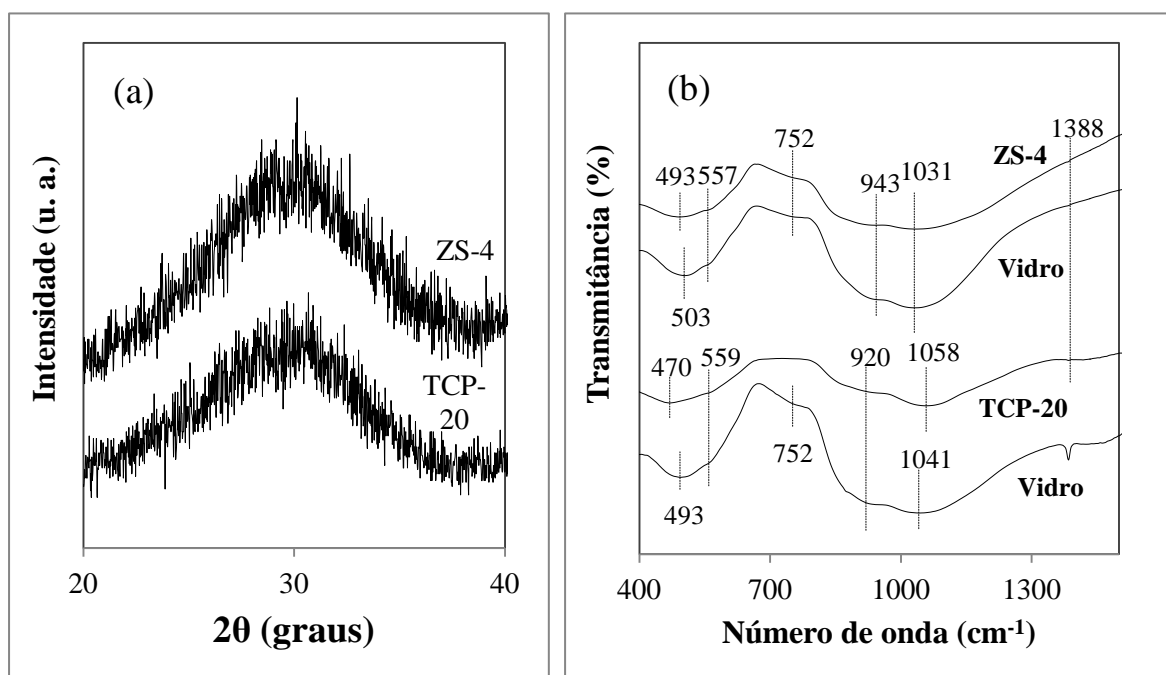


Figura 23 - (a) Difrátogramas e (b) FTIR dos vidros após o teste de degradação.

4.3 Avaliação *in vivo*

Os ensaios *in vivo* foram iniciados com um atraso de cerca de 6 meses uma vez que a contratação entre as instituições envolvidas só ficou estabelecida em Julho de 2013. A sua realização prática foi feita tal como planeado mas, dada a morosidade dos procedimentos relacionados com a preparação do tecido ósseo para análise histológica, não houve possibilidade de os concluir em tempo útil de forma a poder incluir os resultados dessa análise na presente tese. Assim sendo, só foi possível incluir nesta tese os resultados relativos à avaliação histológica da resposta tecidual à presença dos implantes subcutâneos. De qualquer forma, foi possível ilustrar esta tese com as radiografias aos fêmures realizadas após o sacrifício dos dois animais utilizados, bem como com imagens macroscópicas dos defeitos enxertados na cortical femural.

4.3.1 Implantes subcutâneos

4.3.1.1 Resposta inflamatória aos implantes de vidro bioativo

A sequência de eventos que ocorre após implantação de um biomaterial *in vivo*, inclui as fases: resposta inflamatória aguda, resposta inflamatória crónica, desenvolvimento de tecido granuloso e por fim, reação de corpo estranho. A duração e a intensidade de cada uma das fases referidas são dependentes do tamanho, da forma e das propriedades químicas e físicas do biomaterial. Assim, a resposta inflamatória pode caracterizar a sua biocompatibilidade. Geralmente, a biocompatibilidade de um material com os tecidos é descrita em termos das respostas inflamatórias agudas e crónicas e da formação de uma cápsula fibrosa. A análise histológica do tecido adjacente aos materiais implantados tem sido o método mais utilizado para a obtenção avaliação da biocompatibilidade [64].

Quando os estímulos inflamatórios são persistentes, levam à presença de inflamação crónica e esta está confinada ao local de implantação do biomaterial. Em geral, a inflamação crónica é caracterizada pela presença de macrófagos, monócitos, linfócitos, plasmócitos e pela proliferação de vasos sanguíneos e de tecido conjuntivo. É preciso ter em conta que muitos fatores modificam a evolução e a aparência histológica deste tipo de inflamação [64].

Por vezes, o desenvolvimento do tecido granuloso é considerado como parte da inflamação crónica mas, devido às interações únicas entre o material e o tecido, é preferível diferenciá-la da reação de corpo estranho, que por sua vez é caracterizada por um grau de desenvolvimento diferente do tecido granuloso, e ainda inclui a presença de macrófagos, fibroblastos e a formação de capilares. Os novos vasos sanguíneos são formados a partir de vasos pré-existentes num processo conhecido como neovascularização ou angiogénese. Este processo envolve a proliferação, maturação e organização de células endoteliais em tubos capilares [64].

Na reação de corpo estranho, é possível ainda verificar a presença de células gigantes, que são formadas pela fusão de monócitos/macrófagos, numa tentativa de fagocitar o implante. Esta reação pode persistir na interface entre o implante e o tecido durante a “vida útil” do material. Geralmente o biomaterial é envolvido por uma cápsula fibrosa juntamente com as reações de corpo estranho que se desenvolveram, isolando o implante do ambiente local do tecido [64].

4.3.1.2 Análise histológica

Após a recolha dos tecidos em contacto com os implantes subcutâneos, estes foram avaliados segundo a norma internacional ISO – 10993-6: “Avaliação biológica de dispositivos médicos – Parte 6: Testes para efeitos locais após implantação”.

A avaliação histológica, através de microscopia, permitiu verificar a existência de vários tipos de células como eosinófilos, linfócitos, células plasmáticas, macrófagos e células gigantes, e também a necrose das mesmas, e ainda investigar a resposta dos tecidos ao nível da neovascularização, fibrose e infiltração lipídica.

A pontuação semi-quantitativa permitiu apurar se as composições vítreas em estudo são irritativas ou não-irritativas, sendo assim possível considerar os materiais biocompatíveis ou não.

Os resultados demonstraram que todas as composições testadas se mostraram ligeiramente irritantes, tendo em conta a classificação apresentada na Tabela 6. A composição 45S5 Bioglass[®] obteve 4,4, o TCP-20 obteve 4,61 e por fim, o ZS-4 obteve

6,0, sendo que todos os valores se enquadram dentro dos valores correspondentes aos materiais ligeiramente irritantes. As tabelas de avaliação finais, obtidas segundo a norma ISO referida acima estão apresentadas no Anexo I da presente tese.

Tabela 6 - Classificação semi-quantitativa dos implantes segundo o grau de irritação. Adaptado de (ISO - 10993-6).

Classificação:	Avaliação semi-quantitativa:
Não irritante	De 0,0 a 2,9
Ligeiramente irritante	De 3,0 a 8,9
Moderadamente irritante	De 9,0 a 15,0
Severamente irritante	Acima de 15

Tendo em conta os aspetos referidos na secção 4.3.1.1 relativos às características da resposta inflamatória aos biomateriais, e através da análise histológica realizada, foi possível observar os resultados obtidos nas imagens microscópicas de algumas secções dos tecidos em contacto com os implantes.

Relativamente à cápsula fibrosa desenvolvida à volta dos implantes, é possível ver nas imagens da Figura 24 que no caso do biovidro ZS-4 (c), esta é ligeiramente mais espessa, comparando com as do 45S5 Bioglass® e TCP-20.

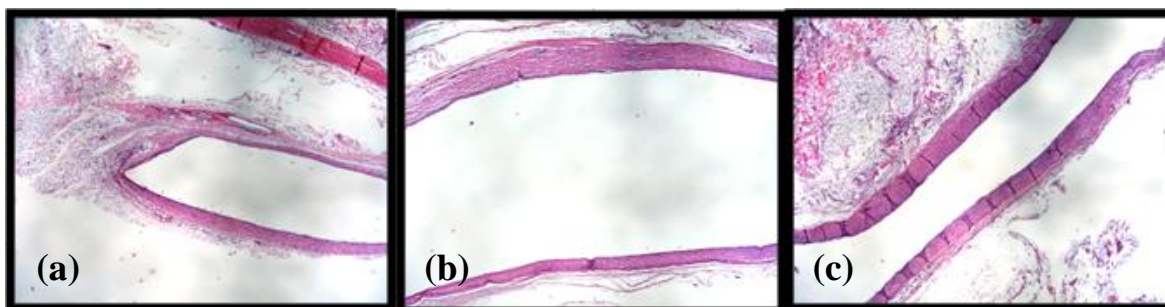


Figura 24 - Imagens microscópicas das cápsulas fibrosas dos três materiais: (a) 45S5 Bioglass®, (b) TCP-20 e (c) ZS-4. Hematoxilina-eosina(HE), ampliação de 2X.

A existência de neovascularização, característica da resposta inflamatória, foi verificada para os tecidos adjacentes aos três materiais implantados, sendo que foi mais acentuada no caso do biovidro ZS-4, como se pode ver pelas tabelas de avaliação utilizadas apresentadas no Anexo I da presente tese. A imagem da Figura 25 permite a observação da existência de vasos sanguíneos como resposta à implantação do vidro comercial 45S5 Bioglass®. Na Figura 25, é também possível ver a existência de neutrófilos (seta amarela) e macrófagos (seta verde). Na Figura 26 é possível ver a presença de neutrófilos nos tecidos adjacentes a um dos implantes do biovidro TCP-20.

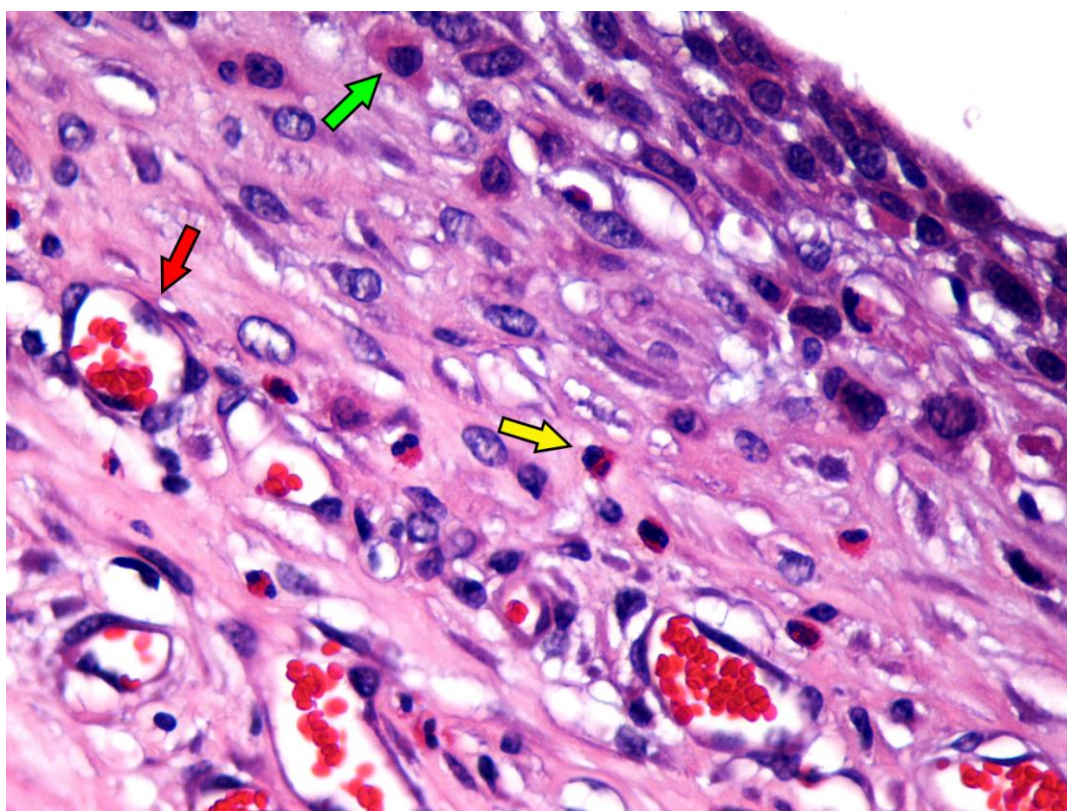


Figura 25 – Cápsula que rodeava um implante de 45S5 com neovascularização (seta vermelha) e presença de neutrófilos (seta amarela) e de macrófagos (seta verde). HE, 40X

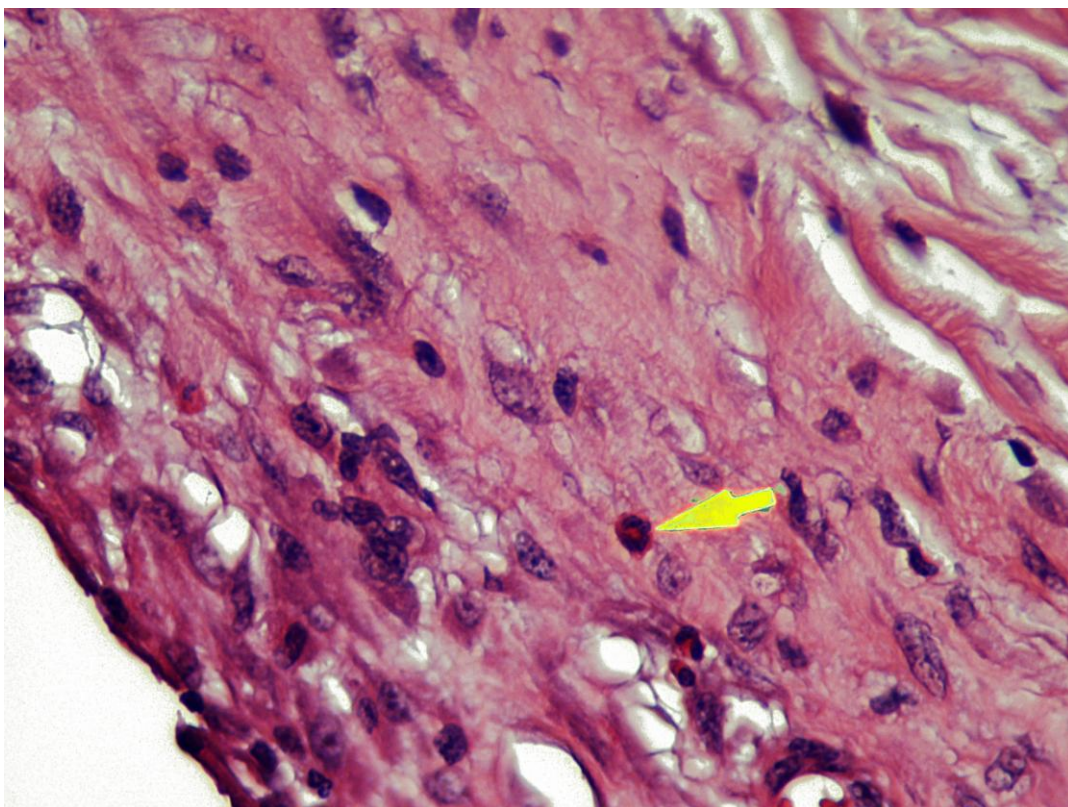


Figura 26 - Neutrófilo (seta amarela) em cápsula que rodeava um implante de TCP-20. HE, 40X.

Nos tecidos adjacentes ao biovidro 45S5 Bioglass[®], além dos neutrófilos e dos macrófagos observados pela Figura 25, também foi possível verificar a existência de plasmócitos (Figura 27), células características da inflamação crônica. Os plasmócitos foram encontrados nos tecidos adjacentes aos três biovidros implantados.

Os tecidos adjacentes aos implantes do biovidro ZS-4 foram os que apresentaram maior quantidade de células gigantes. A Figura 28 permite observar a existência deste tipo de células, características da resposta tecidual.

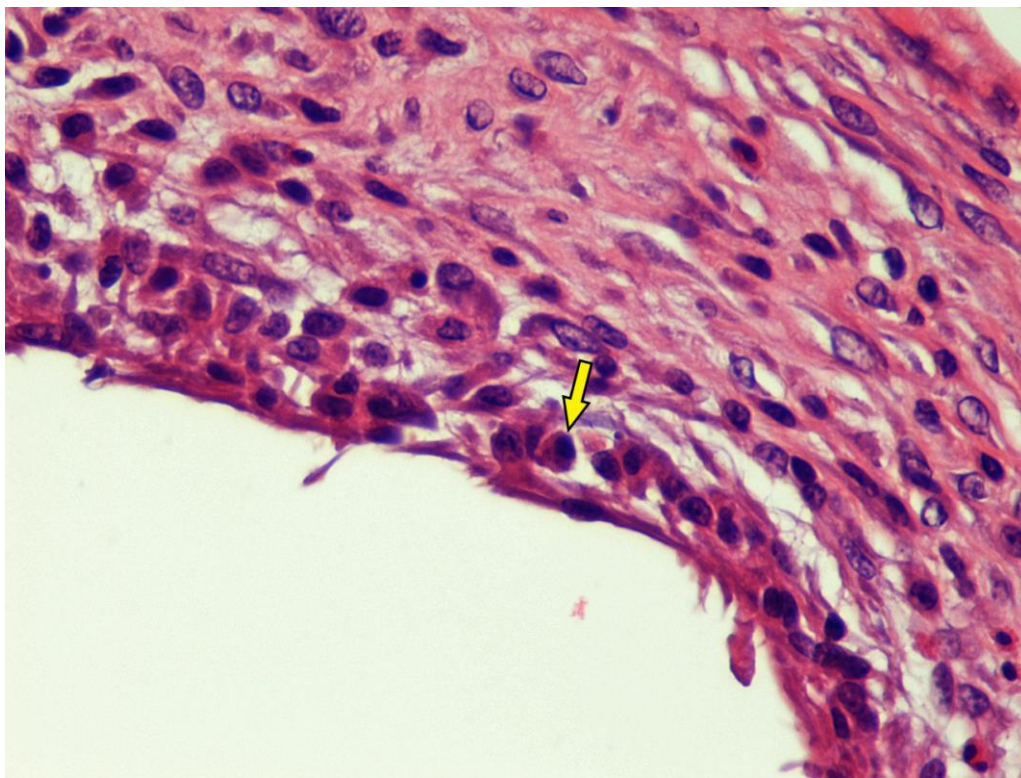


Figura 27 - Plasmócito (seta amarela) na cápsula que rodeava um implante de 45S5. HE, 40X.

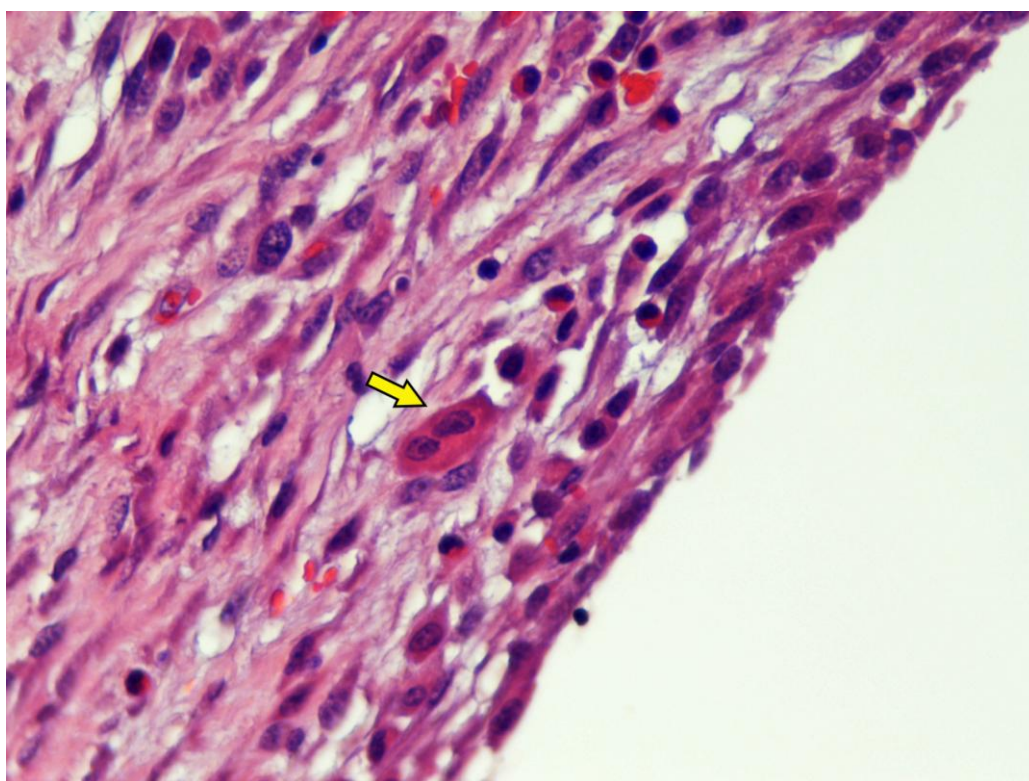


Figura 28 - Célula gigante de corpo estranho (seta amarela) na cápsula de um implante de ZS-4. HE, 40X.

Os implantes recolhidos foram ainda analisados através de SEM e comparados com as respectivas placas que não foram utilizadas, por forma a perceber as alterações que ocorreram no material após 1 mês de implantação. As imagens obtidas por SEM dos implantes estão apresentadas na Figura 29.

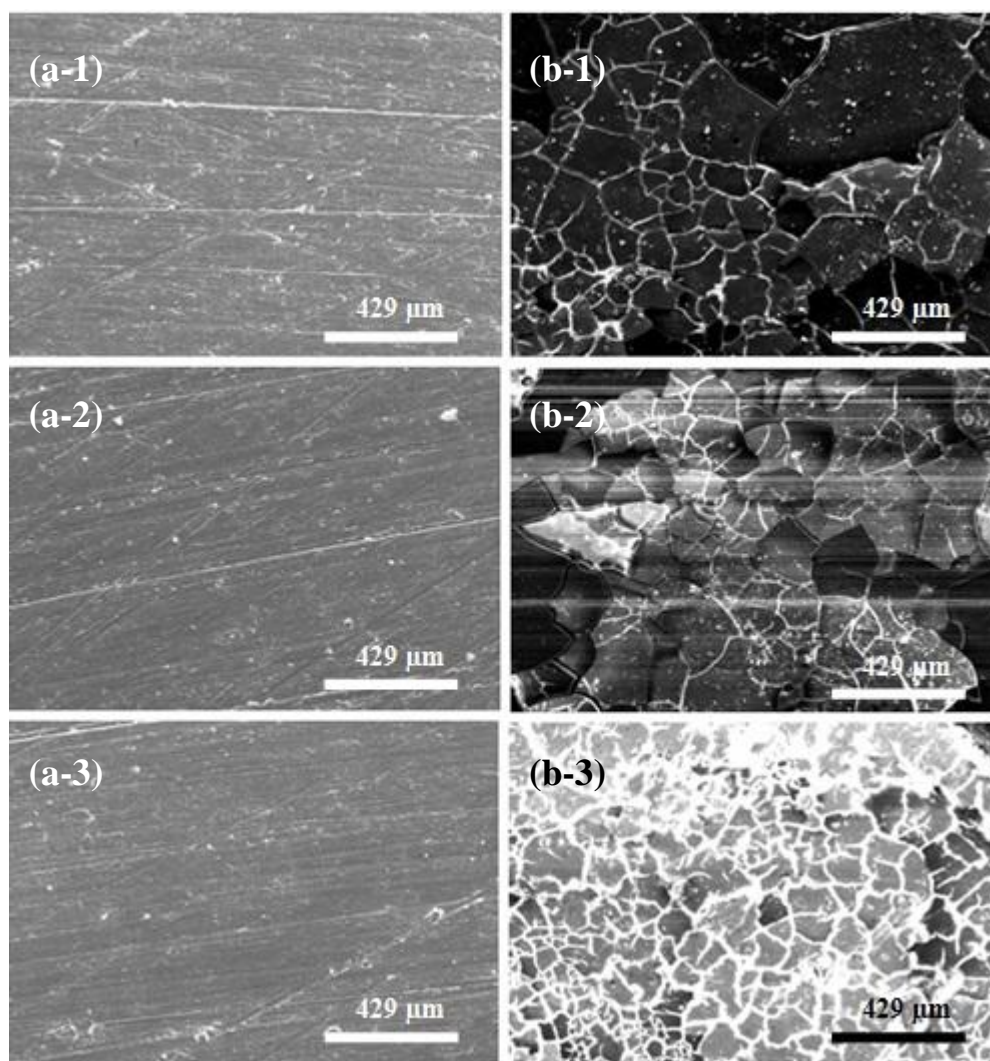


Figura 29 - Micrografias de SEM dos implantes de 45S5 Bioglass® (1), TCP-20 (2) e ZS-4 (3), (a) antes e (b) depois da implantação.

Através das imagens obtidas é possível verificar que após a implantação ocorreu mineralização das amostras, uma vez que se vê claramente que existe uma camada superficial de hidroxiapatite carbonatada. Esta camada encontra-se fraturada, sendo este o

aspeto típico de camadas resultantes da biomineralização *in vitro* e *in vivo* que contraem durante a secagem [5,86].

4.3.2 Pós

Após a recolha dos ossos para análise, estes foram radiografados, sendo as radiografias apresentadas nas imagens da Figura 30. Está também apresentada a radiografia de um fémur recolhido (a meio) onde, após a eutanásia e na face anterior da diáfise, foram implantados os mesmos biomateriais. Pretende-se assim simular o dia 0 para avaliar a evolução do comportamento radiográfico dos vidros bioativos utilizados durante implantação *in vivo*.

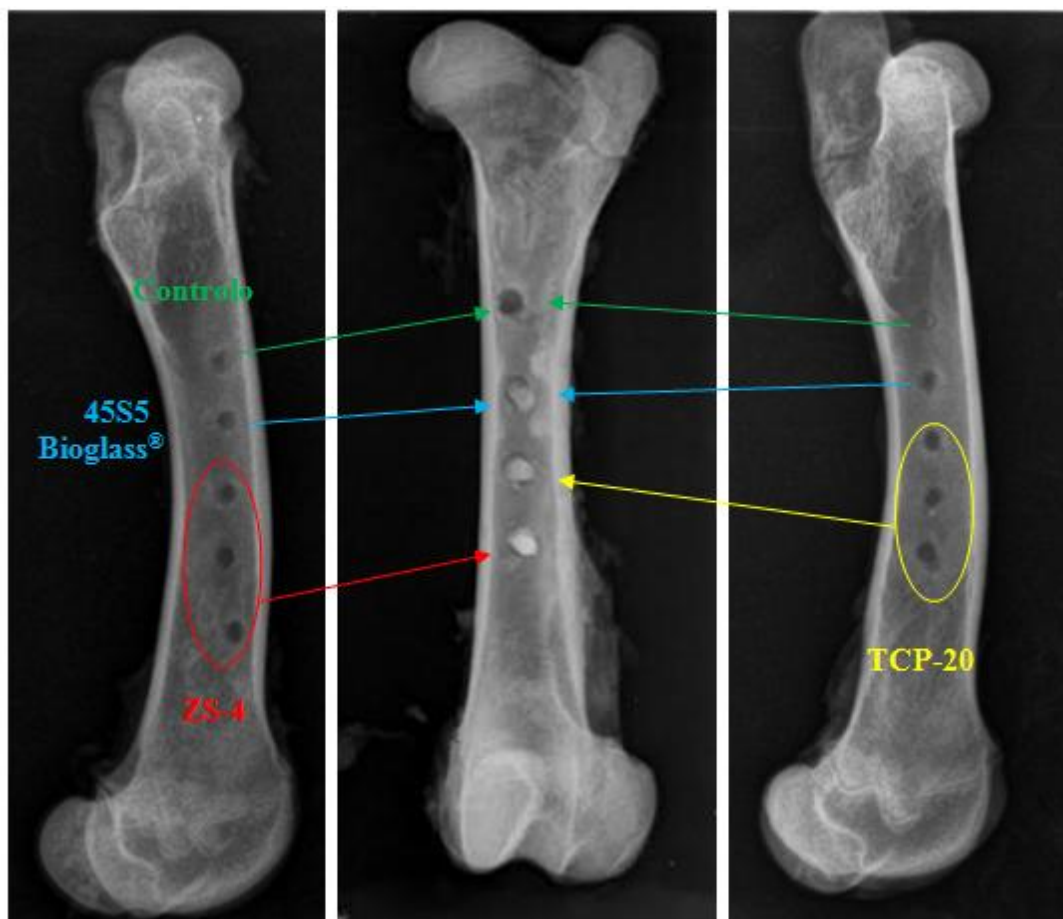


Figura 30 - Radiografias do osso após implantação dos materiais, fémur esquerdo com ZS-4 e fémur direito com TCP-20; radiografia do osso sem ser implantado, a meio.

Como é possível verificar na Figura 30, a radiopacidade dos 3 vidros bioativos implantados diminuiu consideravelmente, possivelmente devido à sua degradação ao longo dos 31 dias de implantação, podendo também estar relacionada com a formação de osso novo, suposições que só poderão ser verificadas através da análise histológica.

Tendo em conta o que é reportado na literatura, a radiopacidade de pós de vidro é geralmente baixa, ou seja, são pouco radiopacos e por isso a sua observação e diferenciação do tecido ósseo é dificultada [87]. Através da Figura 30 já referida, é também possível verificar que os pós das duas composições em estudo, TCP-20 e ZS-4, são mais radiopacos que os do vidro bioativo comercial 45S5 Bioglass®.

Para a preparação das amostras dos defeitos enxertados na cortical femural para análise histomorfométrica, foram obtidos os cortes apresentados na Figura 31.

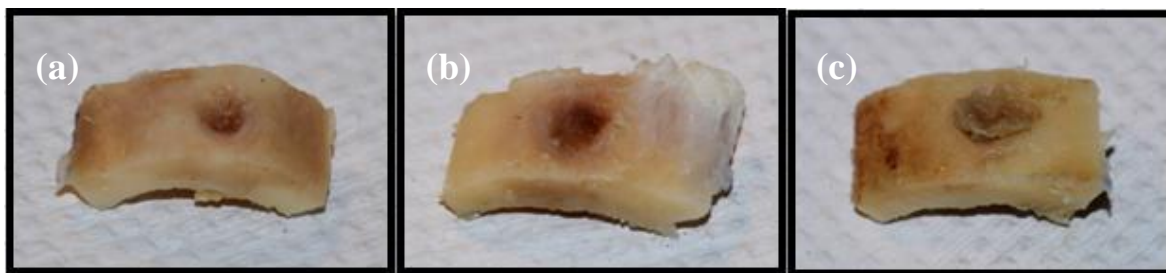


Figura 31 - Segmentos de fémur de ovino onde são observáveis os defeitos enxertados na cortical femural, para as três composições utilizadas: (a) 45S5 Bioglass®, (b) TCP-20 e (c) ZS-4.

É importante referir que os estudos da aplicação *in vivo* dos pós das três composições em estudo foram feitos com base num modelo de defeitos de tamanho não-crítico, sendo por isso um estudo preliminar da capacidade de cada vidro bioativo induzir a formação de novo osso. O uso de defeitos de tamanho não crítico permite a utilização de um menor número de animais sujeitos a teste, o que é um dos maiores problemas éticos relacionados com o uso de modelos animais na área da investigação, e além disso asseguram uma regeneração óssea rápida e segura e uma substituição dos biomateriais num estado avançado dentro dos períodos de observação, neste caso, no período de 1 mês de implantação. Acredita-se que os resultados das avaliações histomorfométricas que se

obtem destes estudos sejam apropriados para estimar a aplicabilidade dos materiais e o seu comportamento quando enxertados em defeitos ósseos de tamanho crítico [88].

CAPÍTULO 5 - Conclusões e Trabalho Futuro

5.1 Conclusões

O objetivo principal da presente tese foi o estudo da aplicação *in vivo* de partículas de biovidro em defeitos ósseos e de implantes subcutâneos na forma de placas, comparando o desempenho de duas composições novas do biovidro FastOsTM (TCP-20 e ZS-4) com o do vidro comercial, 45S5 Bioglass[®], usando a ovelha como modelo animal. As novas composições de biovidros pertencentes ao sistema diopside ($\text{CaMgSi}_2\text{O}_6$) - fluorapatite ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$) - fosfato tricálcico ($3\text{CaO} \cdot \text{P}_2\text{O}_5$) foram também avaliadas *in vitro* através de testes de biomineralização em SBF e de testes de degradação em Tris-HCl, de forma a complementar o trabalho desenvolvido e a justificar a utilização das duas composições específicas em estudo em ensaios *in vivo*. Apesar de ter sido o objetivo principal, por motivos alheios à equipa de investigação, os resultados da avaliação da capacidade regenerativa de defeitos ósseos *in vivo* não foram obtidos em tempo útil de modo a poderem ser incluídos na presente tese.

Os ensaios *in vitro* realizados através da imersão dos pós de biovidro em SBF permitiram verificar o potencial bioativo das duas composições em estudo. Além disso, foi possível aferir que o vidro 45S5 Bioglass[®] possui um desempenho menos favorável ao desenvolvimento de HCA *in vitro*, uma vez que a fase cristalina presente foi a calcite.

Os testes de degradação em Tris-HCl revelaram menores variações de pH ao longo do tempo de imersão e perdas de peso significativamente inferiores para as novas composições em comparação com a amostra do biovidro comercial 45S5 Bioglass[®]. A degradação dos biovidros TCP-20 e ZS-4, para além de resultar em apenas ligeiros aumentos de pH, liberta ainda na solução pequenas doses de espécies iónicas consideradas benéficas em termos de regeneração óssea.

A aplicação subcutânea no dorso dos animais dos materiais em estudo na forma de placas de vidro permitiu confirmar a biocompatibilidade das composições vítreas testadas. Através da análise semi-quantitativa da resposta inflamatória nos tecidos, foi possível classificar as três composições de biovidro apenas como materiais ligeiramente irritantes, o

que não compromete a sua aplicação no organismo, sendo assim considerados biocompatíveis.

Através dos resultados obtidos na presente tese, pode concluir-se que as composições de vidro testadas são materiais promissores para aplicação em regeneração óssea.

5.2 Trabalho Futuro

As composições do vidro bioativo FastOs™ (TCP-20 e ZS-4), testadas *in vivo* na presente tese demonstraram resultados positivos no que diz respeito à biocompatibilidade com os tecidos vivos. Uma vez que os resultados da avaliação histomorfométrica aos defeitos enxertados na cortical femural não foram obtidos em tempo útil de modo a serem incluídos na presente tese não foi possível apurar o seu desempenho e aplicabilidade *in vivo* para regeneração óssea. Estes estudos estão em marcha e serão reportados num futuro próximo na forma de um artigo científico.

CAPÍTULO 6 - Bibliografia

- [1] Lemos I. Fabrication and characterization of modified macroporous bioceramics for bone regeneration. Universidade do Porto, 2008.
- [2] Ratner BD. Biomaterials science: an introduction to materials in medicine. Amsterdam; Boston: Elsevier Academic Press; 2004.
- [3] Azenha M. Resposta óssea ao Biosilicato® e ao Biosilicato®Vítreo implantados em fêmur de coelhos . Universidade de São Paulo, 2010.
- [4] Hench LL, Wilson J. An introduction to bioceramics. Singapore: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd; 1993.
- [5] Goel A, Kapoor S, Rajagopal RR, Pascual MJ, Kim H-W, Ferreira JMF. Alkali-free bioactive glasses for bone tissue engineering: a preliminary investigation. *Acta Biomaterialia* 2012;8:361–72.
- [6] Goel A, Rajagopal RR, Ferreira JMF. Influence of strontium on structure, sintering and biodegradation behaviour of CaO-MgO-SrO-SiO(2)-P(2)O(5)-CaF(2) glasses. *Acta Biomaterialia* 2011;7:4071–80.
- [7] Martin RA, Yue S, Hanna J V, Lee PD, Newport RJ, Smith ME, et al. Characterizing the hierarchical structures of bioactive sol–gel silicate glass and hybrid scaffolds for bone regeneration. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* 2012;370:1422–43.
- [8] Jones JR, Lin S, Yue S, Lee PD, Hanna J V, Smith ME, et al. Bioactive glass scaffolds for bone regeneration and their hierarchical characterisation. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine* 2010;224:1373–87.
- [9] Bi L, Jung S, Day D, Neidig K, Dusevich V, Eick D, et al. Evaluation of bone regeneration, angiogenesis, and hydroxyapatite conversion in critical-sized rat calvarial defects implanted with bioactive glass scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2012;100A:3267–75.
- [10] Giannoudis P V, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: An update. *Injury* 2005;36:S20–S27.
- [11] Stevens MM. Biomaterials for bone tissue engineering. *Materials Today* 2008;11:18–25.
- [12] Vallet-Regí M, Izquierdo-Barba I, Colilla M. Structure and functionalization of mesoporous bioceramics for bone tissue regeneration and local drug delivery. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* 2012;370:1400–21.

- [13] Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL. Bone Tissue Engineering: State of the Art and Future Trends. *Macromolecular Bioscience* 2004;4:743–65.
- [14] Marks Jr SC, Odgren PR. Chapter 1 - Structure and Development of the Skeleton. In: John PB, Lawrence GR, Gideon A. RodanA2 - John P. Bilezikian LGR, Gideon AR, editors. *Principles of Bone Biology* (Second Edition), San Diego: Academic Press; 2002, p. 3–15.
- [15] Stevens MM, George JH. Exploring and Engineering the Cell Surface Interface. *Science* 2005;310:1135–8.
- [16] Bone Remodeling Cycle. <http://www.ns.umich.edu/Releases/2005/Feb05/bone.html> n.d.
- [17] Best SM, Porter AE, Thian ES, Huang J. Bioceramics: Past, present and for the future. *Journal of the European Ceramic Society* 2008;28:1319–27.
- [18] Cormack AN, Tilocca A. Structure and biological activity of glasses and ceramics INTRODUCTION. *Philosophical Transactions of the Royal Society a-Mathematical Physical and Engineering Sciences* 2012;370:1271–80.
- [19] Thamaraiselvi T V, Rajeswari S. Biological Evaluation of Bioceramic Materials - A Review. *Trends Biomater Artif Organs* 2004;18:9–17.
- [20] Vallet-Regí M, Ruiz-Hernández E. Bioceramics: From Bone Regeneration to Cancer Nanomedicine. *Advanced Materials* 2011;23:5177–218.
- [21] Manzano M, Vallet-Regí M. Revisiting bioceramics: Bone regenerative and local drug delivery systems. *Progress in Solid State Chemistry* 2012;40:17–30.
- [22] Elgayar I, Aliev a. E, Boccaccini a. R, Hill RG. Structural analysis of bioactive glasses. *Journal of Non-Crystalline Solids* 2005;351:173–83.
- [23] Structure of a glass network. http://www.rsc.org/images/Coleman-fig2_tcm18-68268.jpg n.d.
- [24] Shelby JE, Lopes M. *Introduction to Glass Science and Technology*. The Royal Society of Chemistry; 2005.
- [25] Oliveira JMM de. *Desenvolvimento de vidros e de vidros cerâmicos sílico-fosfatados com elevado teor de alcalino-terrosos para aplicações biomédicas*. Universidade de Aveiro, 2000.
- [26] Oliveira JM, Correia RN, Fernandes MH, Rocha J. Influence of the CaO/MgO ratio on the structure of phase-separated glasses: a solid state ^{29}Si and ^{31}P MAS NMR study. *Journal of Non-Crystalline Solids* 2000;265:221–9.

- [27] Cormack AN. The Structure of Bioactive Glasses and Their Surfaces. Bio-Glasses, John Wiley & Sons, Ltd; 2012, p. 65–74.
- [28] Tulyaganov DU, Makhkamov ME, Urazbaev A, Goel A, Ferreira JMF. Synthesis, processing and characterization of a bioactive glass composition for bone regeneration. *Ceramics International* 2013;39:2519–26.
- [29] Rahaman MN, Day DE, Sonny Bal B, Fu Q, Jung SB, Bonewald LF, et al. Bioactive glass in tissue engineering. *Acta Biomaterialia* 2011;7:2355–73.
- [30] Serra J, González P, Liste S, Chiussi S, León B, Pérez-Amor M, et al. Influence of the non-bridging oxygen groups on the bioactivity of silicate glasses. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2002;13:1221–5.
- [31] Rezwan K, Chen QZ, Blaker JJ, Boccaccini AR. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2006;27:3413–31.
- [32] Tilocca A. Models of structure, dynamics and reactivity of bioglasses: a review. *Journal of Materials Chemistry* 2010;20:6848–58.
- [33] Paital SR, Dahotre NB. Calcium phosphate coatings for bio-implant applications: Materials, performance factors, and methodologies. *Materials Science and Engineering: R: Reports* 2009;66:1–70.
- [34] Aina V, Malavasi G, Fiorio Pla A, Munaron L, Morterra C. Zinc-containing bioactive glasses: Surface reactivity and behaviour towards endothelial cells. *Acta Biomaterialia* 2009;5:1211–22.
- [35] Vallet-Regí M. Ceramics for medical applications. *J Chem Soc, Dalton Trans* 2001:97–108.
- [36] Jones JR, Hench LL, Sepulveda P. Bioactive Materials for Tissue Engineering Scaffolds. *Future Strategies for Tissue and Organ Replacement*, n.d., p. 3–24.
- [37] Greenspan DC. Bioactive glass: mechanisms of bone bonding 1999.
- [38] Ohgushi H, Dohi Y, Yoshikawa T, Tamai S, Tabata S, Okunaga K, et al. Osteogenic differentiation of cultured marrow stromal stem cells on the surface of bioactive glass ceramics. *Journal of Biomedical Materials Research* 1996;32:341–8.
- [39] Keshaw H, Forbes A, Day RM. Release of angiogenic growth factors from cells encapsulated in alginate beads with bioactive glass. *Biomaterials* 2005;26:4171–9.
- [40] Day RM, Boccaccini AR, Shurey S, Roether JA, Forbes A, Hench LL, et al. Assessment of polyglycolic acid mesh and bioactive glass for soft-tissue engineering scaffolds. *Biomaterials* 2004;25:5857–66.

- [41] Hum J, Boccaccini AR. Bioactive glasses as carriers for bioactive molecules and therapeutic drugs: a review. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* 2012;23:2317–33.
- [42] Bellucci D, Chiellini F, Ciardelli G, Gazzarri M, Gentile P, Sola A, et al. Processing and characterization of innovative scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2012;23:1397–409.
- [43] Hoppe A, Güldal NS, Boccaccini AR. A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. *Biomaterials* 2011;32:2757–74.
- [44] Xynos ID, Edgar AJ, Buttery LDK, Hench LL, Polak JM. Ionic Products of Bioactive Glass Dissolution Increase Proliferation of Human Osteoblasts and Induce Insulin-like Growth Factor II mRNA Expression and Protein Synthesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2000;276:461–5.
- [45] Xynos ID, Hukkanen MVJ, Batten JJ, Buttery LD, Hench LL, Polak JM. Bioglass®45S5 Stimulates Osteoblast Turnover and Enhances Bone Formation In Vitro: Implications and Applications for Bone Tissue Engineering. *Calcified Tissue International* 2000;67:321–9.
- [46] Livingston T, Ducheyne P, Garino J. In vivo evaluation of a bioactive scaffold for bone tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research* 2002;62:1–13.
- [47] Xynos ID, Edgar AJ, Buttery LDK, Hench LL, Polak JM. Gene-expression profiling of human osteoblasts following treatment with the ionic products of Bioglass® 45S5 dissolution. *Journal of Biomedical Materials Research* 2001;55:151–7.
- [48] Ciceo Lucacel R, Ponta O, Simon V. Short-range structure and in vitro behavior of ZnO–CaO–P₂O₅ bioglasses. *Journal of Non-Crystalline Solids* 2012;358:2803–9.
- [49] Bini M, Grandi S, Capsoni D, Mustarelli P, Saino E, Visai L. SiO₂–P₂O₅–CaO Glasses and Glass-Ceramics with and without ZnO: Relationships among Composition, Microstructure, and Bioactivity. *The Journal of Physical Chemistry C* 2009;113:8821–8.
- [50] Kansal I, Goel A, Tulyaganov DU, Santos LF, Ferreira JMF. Structure, surface reactivity and physico-chemical degradation of fluoride containing phospho-silicate glasses. *Journal of Materials Chemistry* 2011;21:8074–84.
- [51] Kansal I, Goel A, Tulyaganov DU, Rajagopal RR, Ferreira JMF. Structural and thermal characterization of CaO–MgO–SiO₂–P₂O₅–CaF₂ glasses. *Journal of the European Ceramic Society* 2012;32:2739–46.
- [52] Goel A, Kapoor S, Tilocca A, Rajagopal RR, Ferreira JMF. Structural role of zinc in biodegradation of alkali-free bioactive glasses. *Journal of Materials Chemistry B* 2013;1:3073–82.

- [53] Singh RK, Srinivasan A. Bioactivity of SiO₂–CaO–P₂O₅–Na₂O glasses containing zinc–iron oxide. *Applied Surface Science* 2010;256:1725–30.
- [54] El-Kady AM, Ali AF. Fabrication and characterization of ZnO modified bioactive glass nanoparticles. *Ceramics International* 2012;38:1195–204.
- [55] Aravindan S, Rajendran V, Rajendran N. Investigations on the Thermal and Elastic Properties of ZnO-Incorporated Phosphate Glasses and Glass Ceramics. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements* 2012;187:831–49.
- [56] Li X, Wang X, He D, Shi J. Synthesis and characterization of mesoporous CaO–MO–SiO₂–P₂O₅ (M = Mg, Zn, Cu) bioactive glasses/composites. *Journal of Materials Chemistry* 2008;18:4103–9.
- [57] Murphy S, Boyd D, Moane S, Bennett M. The effect of composition on ion release from Ca–Sr–Na–Zn–Si glass bone grafts. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2009;20:2207–14.
- [58] O'Donnell MD, Hill RG. Influence of strontium and the importance of glass chemistry and structure when designing bioactive glasses for bone regeneration. *Acta Biomaterialia* 2010;6:2382–5.
- [59] Fredholm YC, Karpukhina N, Law R V., Hill RG. Strontium containing bioactive glasses: Glass structure and physical properties. *Journal of Non-Crystalline Solids* 2010;356:2546–51.
- [60] SCHEPERS EJG, DUCHEYNE P. Bioactive glass particles of narrow size range for the treatment of oral bone defects: a 1–24 month experiment with several materials and particle sizes and size ranges. *Journal of Oral Rehabilitation* 1997;24:171–81.
- [61] Schepers EJ, Ducheyne P, Barbier L, Schepers S. Bioactive glass particles of narrow size range: a new material for the repair of bone defects. *Implant Dentistry* 1993;2:151–6.
- [62] Vogel M, Voigt C, Gross UM, Müller-Mai CM. In vivo comparison of bioactive glass particles in rabbits. *Biomaterials* 2001;22:357–62.
- [63] Silva GA, Coutinho OP, Ducheyne P, Reis RL. Materials in particulate form for tissue engineering. 2. Applications in bone. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 2007;1:97–109.
- [64] Anderson JM. BIOLOGICAL RESPONSES TO MATERIALS. *Annual Review of Materials Research* 2001;31:81–110.
- [65] Morais J, Papadimitrakopoulos F, Burgess D. Biomaterials/Tissue Interactions: Possible Solutions to Overcome Foreign Body Response. *The AAPS Journal* 2010;12:188–96.

- [66] Kokubo T. Bioactive glass ceramics: properties and applications. *Biomaterials* 1991;12:155–63.
- [67] Cüneyt Tas A. Synthesis of biomimetic Ca-hydroxyapatite powders at 37°C in synthetic body fluids. *Biomaterials* 2000;21:1429–38.
- [68] Kokubo T, Takadama H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials* 2006;27:2907–15.
- [69] Kokubo T, Kushitani H, Sakka S, Kitsugi T, Yamamuro T. Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W3 1990;24:721–34.
- [70] Tas AC. Synthesis of biomimetic Ca-hydroxyapatite powders at 37 degrees C in synthetic body fluids. *Biomaterials* 2000;21:1429–38.
- [71] Cerruti MG. Characterization of bioactive glasses . Effect of the immersion in solutions that simulate body fluids . 2004.
- [72] Santos TSXC dos. In vivo assessment of the host reactions to natural origin biomaterials aimed to be used as wound dressers and as bone tissue engineering scaffolds. Universidade do Minho, n.d.
- [73] Pearce a I, Richards RG, Milz S, Schneider E, Pearce SG. Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. *European Cells & Materials* 2007;13:1–10.
- [74] Schimandle JH, Boden SD. Spine update. The use of animal models to study spinal fusion. *Spine* 1994;19:1998–2006.
- [75] Nuss KMR, Auer J a, Boos A, Von Rechenberg B. An animal model in sheep for biocompatibility testing of biomaterials in cancellous bones. *BMC Musculoskeletal Disorders* 2006;7:67.
- [76] Peitl O, Dutra E, Hench LL. Highly bioactive P 2 O 5 - Na 2 O - CaO - SiO 2 glass-ceramics 2001;292.
- [77] Aguiar H, Serra J, González P, León B. Structural study of sol–gel silicate glasses by IR and Raman spectroscopies. *Journal of Non-Crystalline Solids* 2009;355:475–80.
- [78] Rajagopal RR. Preparation and characterisation of bioglasses doped with Sr and Zn. Universidade de Aveiro, 2011.
- [79] Pedone A, Charpentier T, Malavasi G, Menziani MC. New Insights into the Atomic Structure of 45S5 Bioglass by Means of Solid-State NMR Spectroscopy and Accurate First-Principles Simulations. *Chemistry of Materials* 2010;22:5644–52.
- [80] Stoch A, Jastrzębski W, Brożek A, Trybalska B, Cichocińska M, Szarawara E. FTIR monitoring of the growth of the carbonate containing apatite layers from simulated and natural body fluids. *Journal of Molecular Structure* 1999;511–512:287–94.

- [81] Lefèvre G. In situ Fourier-transform infrared spectroscopy studies of inorganic ions adsorption on metal oxides and hydroxides. *Advances in Colloid and Interface Science* 2004;107:109–23.
- [82] Levinson R. *More Modern Chemical Techniques*. Royal Society of Chemistry; 2001.
- [83] Kapoor S, Goel A, Pascual MJ, Ferreira JMF. Thermo-mechanical behaviour of alkali free bioactive glass-ceramics co-doped with strontium and zinc. *Journal of Non-Crystalline Solids* 2013;375:74–82.
- [84] Kansal I, Goel A, Tulyaganov DU, Pascual MJ, Lee H-Y, Kim H-W, et al. Diopside (CaO[middle dot]MgO[middle dot]2SiO₂)-fluorapatite (9CaO[middle dot]3P₂O₅[middle dot]CaF₂) glass-ceramics: potential materials for bone tissue engineering. *Journal of Materials Chemistry* 2011;21:16247–56.
- [85] Kaur G, Pandey OP, Singh K, Homa D, Scott B, Pickrell G. A review of bioactive glasses: Their structure, properties, fabrication, and apatite formation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2013:1–21.
- [86] Vallet-Regí M, Romero AM, Ragel C V, LeGeros RZ. XRD, SEM-EDS, and FTIR studies of in vitro growth of an apatite-like layer on sol-gel glasses. *Journal of Biomedical Materials Research* 1999;44:416–21.
- [87] Mohn D, Zehnder M, Imfeld T, Stark WJ. Radio-opaque nanosized bioactive glass for potential root canal application: evaluation of radiopacity, bioactivity and alkaline capacity. *International Endodontic Journal* 2010;43:210–7.
- [88] Cortez PP. Modified calcium phosphates used for bone tissue regeneration: In vivo studies in an ovine model. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, 2011.

ANEXO I – Avaliação semi-quantitativa da resposta inflamatória aos implantes subcutâneos

No presente anexo estão apresentadas as tabelas utilizadas para a contagem das células e da classificação do grau de neovascularização, fibrose e infiltração lipídica. O modelo de avaliação utilizado foi seguido pela norma internacional ISO – 10993-6: “Avaliação biológica de dispositivos médicos – Parte 6: Testes para efeitos locais após implantação”.

	45S5A			45S5B			45S5C			45S5E			45S5F			Total	Média
Células polimorfonucleares	1	1	3	1	1	2	0	1	1	1	0	1	2	1	2	18	1
Linfócitos	2	1	2	1	1	0	1	0	0	0	1	1	2	1	1	14	1
Plasmócitos	1	1	0	2	1	1	0	0	1	1	0	2	0	0	0	10	1
Macrófagos	1	0	2	1	1	2	0	0	0	0	0	0	1	0	1	9	1
Células gigantes	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
Necrose	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Subtotal																7,2	
Neovascularização	1	2	1	0	1	1	0	1	0	2	2	1	2	1	0	15	1
Fibrose	3	3	2	2	2	3	1	1	1	1	1	1	2	1	2	26	2
Infiltração lipídica	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2	0
Subtotal																2,86	
TOTAL																10,06	

Figura 32 - Tabela da avaliação semi-quantitativa dos implantes do biovidro 45S5 Bioglass®.

	TCP20A			TCP20B			TCP20C			TCP20D			TCP20E			TCP20F			Total	Média
Células polimorfonucleares	3	1	1	3	1	3	0	2	2	1	0	1	1	1	2	1	1	2	24	1
Linfócitos	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	19	1
Plasmócitos	0	1	0	2	3	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	13	1
Macrófagos	0	1	0	1	1	0	0	1	2	0	1	0	1	0	0	1	0	1	10	1
Células gigantes	0	0	0	1	0	1	0	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	5	0
Necrose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Subtotal																			7,88	
Neovascularização	0	2	0	0	0	0	1	1	2	1	2	1	2	2	0	1	0	1	16	1
Fibrose	2	2	1	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	2	1	1	1	27	2
Infiltração lipídica	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Subtotal																			2,38	
TOTAL																			10,27	

Figura 33 - Tabela da avaliação semi-quantitativa dos implantes do biovidro TCP-20.

	ZS4A			ZS4B			ZS4C			ZS4D			ZS4E			ZS4F			Total	Média
Células polimorfonucleares	1	3	2	1	1	1	1	1	3	0	0	0	1	2	1	1	0	0	19	1
Linfócitos	1	1	2	3	3	3	2	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	23	1
Plasmócitos	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	7	0
Macrófagos	1	0	2	2	1	1	1	1	2	1	1	0	1	1	0	1	1	0	17	1
Células gigantes	1	0	2	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	7	0
Necrose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Subtotal																			8,11	
Neovascularização	2	2	1	2	2	2	1	1	2	2	2	1	1	1	1	2	2	2	29	2
Fibrose	2	2	2	3	3	3	3	3	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	33	2
Infiltração lipídica	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
Subtotal																			3,55	
TOTAL																			11,66	

Figura 34 - Tabela da avaliação semi-quantitativa dos implantes do biovidro ZS-4.